

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE**

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza:06/A4

Settore Scientifico disciplinare: MED/08

**PROFILI DI ESPRESSIONE GENETICA ED EPIGENETICA AD
IMPATTO PROGNOSTICO E PREDITTIVO NEL CARCINOMA
SQUAMOSO E NELLE LESIONI POTENZIALMENTE
MALIGNEDEL CAVO ORALE**

Presentata da: DAVIDE BARTOLOMEO GISSI

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. PIER LUIGI LOLLINI

Prof.ssa MARIA PIA FOSCHINI

Esame finale anno 2015

INDICE

CARCINOMA QUAMOSO DEL CAVO ORALE.....	6
PREMESSA GENERALE.....	6
EPIDEMIOLOGIA.....	7
FATTORI DI RISCHIO.....	8
Fumo.....	8
Alcol.....	9
Human Papilloma Virus (HPV).....	9
SCOPO DEL PROGETTO DI DOTTORATO.....	12
PARTE 1: DIAGNOSI PRECOCE.....	13
Lesioni Potenzialmente Maligne.....	13
Leucoplachia.....	13
Lichen Planus Orale.....	17
Metodiche di prelievo e marker predittivi.....	21
LAVORO 1: ANALISI DI METILAZIONE DEL DNA MEDIANTE METODICA DI PRELIEVO NON INVASIVO PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL CANCRO ORALE.....	26
Introduzione.....	26
Materiali e metodo.....	26
Risultati.....	31
Discussione e Conclusioni.....	40
LAVORO 2: ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHIMICA DELLA P16^{INK4A} COME MARKER PROGNOSTICO E COME INDICATORE DI INFEZIONE DA HPV IN PAZIENTI AFFETTI DA LPO.....	44
Introduzione.....	44
Materiali e metodo.....	45
Risultati.....	49
Discussione e Conclusioni.....	50

PARTE 2: SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI.....	52
Classificazione e clonalità.....	52
LAVORO 3: PARAMETRI CLINICI E ISTOLOGICI PREDITTIVI DI SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI.....	57
Introduzione.....	57
Materiali e metodo.....	57
Risultati.....	61
Discussione e Conclusioni.....	65
LAVORO 4: ANALISI DELLA REGIONE D-loop del DNA MITOCONDRIALE NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI DEL CAVO ORALE.....	67
Introduzione.....	67
Materiali e metodo.....	69
Risultati.....	71
Discussione e Conclusioni.....	85
BIBLIOGRAFIA.....	88
INDICE DELLE FIGURE.....	105
INDICE DELLE TABELLE.....	106
INDICE DEI GRAFICI.....	107
PUBBLICAZIONI.....	108

ABBREVIAZIONI

CSO: Carcinoma Squamoso del cavo Orale

OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità

AIRC: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

HPV: Human Papilloma Virus

HR HPV: High Grade Human Papilloma Virus

LR HPV: Low Grade Human Papilloma Virus

LPM: Lesioni Potenzialmente Maligne

HG SIL: High Grade Squamous Intraepithelial Lesion

LG SIL: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion

RL: Recidiva Locale

STP: Secondo Tumore Primitivo

LPO: Lichen Planus Orale

LLO: Lesione Lichenoide Orale

NGS: Next Generation Sequencing

SFT: Second Field Tumor

LOH: Loss Of Heterozigosity

ML: Metastasi Linfonodale

mtDNA: DNA mitocondriale

CARCINOMA SQUAMOSO DEL CAVO ORALE

PREMESSA GENERALE

Il Carcinoma Squamoso del cavo Orale (CSO) è un tumore maligno che trae origine dall'epitelio di rivestimento del cavo orale. È il tumore maligno più frequente del distretto testa-collo. Può interessare tutti i siti del cavo orale: le labbra, la lingua, le gengive e il pavimento della bocca; mentre nella nomenclatura di CSO non vengono inclusi i tumori che originano dalle ghiandole salivari e dall'ipofaringe. Si può diffondere per dare metastasi a livello dei linfonodi del distretto testa-collo, tuttavia la diffusione metastatica può avvenire anche per via ematica, prevalentemente arrivando ai polmoni.

È tra le forme più comuni di neoplasia nei paesi sviluppati, colpisce entrambi i sessi con una prevalenza maschile e colpisce maggiormente intorno alla V-VI decade di vita. La sopravvivenza a 5 anni è inferiore al 50% e nonostante i passi avanti in termini di diagnosi precoce e trattamento in campo oncologico negli ultimi vent'anni non è sensibilmente migliorata.

Una diagnosi tardiva ha un impatto importante non solo in termini di sopravvivenza ma anche in termini di qualità di vita del paziente dal momento che coinvolge funzioni assai fondamentali della vita dell'uomo, quali la respirazione, la deglutizione, la fonazione e non ultimo l'estetica.

Una seconda caratteristica sfavorevole di tale neoplasia è che un discreto numero di pazienti affetti da CSO tendono a sviluppare nuovi tumori, a livello locale o loco-regionale.

Lo sviluppo di una seconda manifestazione tumorale ha un forte impatto sulla sopravvivenza a lungo termine e compromette la prognosi anche in quei pazienti diagnosticati precocemente e in cui il tumore è stato trattato nelle fasi iniziali.

EPIDEMIOLOGIA

I dati epidemiologici indicano che il CSO è una patologia tutt'altro che rara. Infatti, tra tutti i tumori maligni, i tumori del distretto testa-collo (cavo orale e faringe) sono per incidenza al sesto posto nel mondo, rispettivamente all'ottavo nei paesi sviluppati e addirittura al terzo nei paesi in via di sviluppo [1]. La maggior parte di tumori del distretto testa-collo sono CSO. Nel 2000, su 400.000 casi verificatisi, 260.000 sono in cavità orale e 120.000 nell'orofaringe [2].

Un'elevata percentuale di pazienti affetti da CSO è stata rilevata nel subcontinente indiano (a causa dell'abitudine di masticare foglie di betel e tabacco) in Europa, in America Meridionale e in Oceania [2-3]. A Taiwan il CSO rappresenta la prima causa di morte tra i giovani maschi tra 25 e 44 anni, probabilmente per il progressivo aumento del consumo di betel in questo gruppo di queste persone [4-5].

In Italia, l'incidenza di CSO raggiunge i 8,4 casi/100.000 abitanti per anno ed è, secondo i dati, maggiore in nord-Italia, dove raggiunge i 12.1 casi/100.000 abitanti per anno [6].

Tra i dati epidemiologici da evidenziare è che negli ultimi anni si è avuto un maggior interessamento della popolazione femminile, una più frequente comparsa di casi "giovanili" e un'assenza di miglioramento nella prognosi e nella terapia.

Il CSO, infatti, è da sempre considerato come un tumore "maschile" ma negli ultimi vent'anni il rapporto uomo:donna è passato da 3:1 a 2:1. Una probabile spiegazione del dato è l'incremento del fumo di sigaretta nella popolazione femminile [1].

Solitamente si presenta prevalentemente nella V, VI e VII decade di vita anche se negli ultimi anni sembra essere drammaticamente aumentata in USA ed Europa l'incidenza di casi diagnosticati sotto i 45 anni [7-9].

Il CSO è considerato un tumore con prognosi infausta. La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è complessivamente del 45% dei casi ed è maggiore per le donne (54%) rispetto agli uomini (41%) [10-12]. Per quanto riguarda l'Italia la mortalità è di circa 3000 individui all'anno [10], è in assoluto tra le più alte ed è rimasta inspiegabilmente costante rispetto a quello che è avvenuto per altri tumori maligni (mammella, colon, melanoma) dove recentemente si è avuto un incremento della sopravvivenza.

L'analisi delle curve di mortalità per il carcinoma oro-faringeo per il periodo compreso tra il 1951 e il 2001 mostrano una stabilità in quasi tutti i paesi europei ed extraeuropei sia per quanto riguarda il sesso maschile che il sesso femminile (FIGURA 1 e 2).

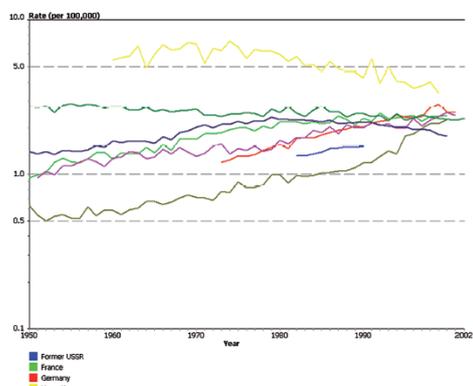


Figura 1: stabilità delle curve di mortalità per carcinoma oro-faringeo ogni 100.000 individui di sesso femminile nel periodo 1951-2001 (OMS-AIRC)

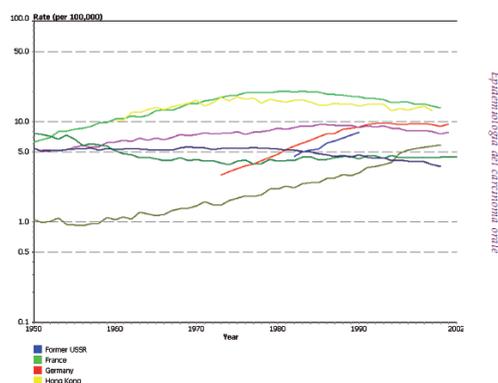


Figura 2: stabilità delle curve di mortalità per carcinoma oro-faringeo ogni 100.000 individui di sesso maschile nel periodo 1951-2001 (OMS-AIRC)

FATTORI DI RISCHIO

Il fumo di tabacco e l'abuso di sostanze alcoliche sono tra i principali fattori di rischio per l'insorgenza del CSO: si stima che circa l'80% dei CSO siano dovuti a tali agenti [13-14].

Evidenze scientifiche tuttavia suggeriscono anche la presenza di altri fattori nel meccanismo di cancerogenesi o co-cancerogenesi orale. Tra questi sono stati riportati: agenti infettivi, fattori nutrizionali e dietetici, condizioni di scarsa igiene orale, traumatismi orali cronici, radiazioni ultraviolette, stati di immunodepressione, fattori genetici.

Tabacco

La stretta associazione tra abitudine al fumo di tabacco ed insorgenza del CSO è testimoniata in maniera inequivocabile. È stato stimato che l'80% dei soggetti affetti da tale neoplasia sono o sono stati fumatori [15]. Il rischio di sviluppare il tumore aumenta di circa 6 volte nei fumatori di più di 20 sigarette al giorno ed è dose-dipendente [16]. Nei fumatori con più di 20 sigarette il rischio sembra essere doppio rispetto ai fumatori con meno di 20 sigarette [17]. Il fumo di sigaro e pipa comporta un maggior rischio rispetto a quello di sigaretta, ma sono molto meno diffusi. In pazienti già trattati per carcinoma squamoso il fumo resta un

fattore di rischio per lo sviluppo di una seconda neoplasia, incrementandolo da 2 a 6 volte [18].

Il fumo di sigaretta agisce direttamente come stimolo irritativo causato dal calore, e indirettamente con la liberazione di sostanze cancerogene (almeno 40 nel fumo di sigaretta), tra cui benzopirene, radicali liberi come idrochinone e N-nitrosamine [19].

Anche il consumo di tabacco non fumato (tabacco masticato e snuff, che consiste nel mantenere quantità di tabacco triturato nel fornice labiale, tra gengiva e labbro) è stato correlato all'insorgenza del CSO. In alcune paesi, inoltre, è diffusa l'usanza di masticare tabacco frammisto ad altre sostanze, che potrebbero aumentarne l'effetto cancerogeno. È il caso del *quid*, una miscela di tabacco, noci di areca, lime ed altre spezie avvolta in una foglia di betel. L'usanza di masticare quid è diffusa in India e nel Sud-est asiatico e il rischio di sviluppare CSO nei consumatori di quid è pari all'8% [20].

Alcol

Negli Stati Uniti, circa un terzo dei soggetti affetti da CSO è un forte consumatore di sostanze alcoliche [15]. I forti bevitori (più di 100 grammi di alcool al giorno) presentano un rischio 30 volte maggiore di sviluppare carcinoma orale ed orofaringeo [21]. Analogamente al fumo di sigaretta anche per l'alcol il rischio relativo risulta dose-dipendente. Studi epidemiologici hanno dimostrato che fumo e tabacco sono fattori di rischio indipendenti, tuttavia se combinati si ottiene un effetto non additivo ma sinergico, di potenziamento: l'incidenza aumenta di 6-15 volte nei consumatori di entrambi [22].

Studi sperimentali hanno dimostrato che l'etanolo non ha di per se azione mutagenica; pertanto l'azione cancerogena delle bevande alcoliche sarebbe dovuta a meccanismi indiretti. L'alcol potrebbe fungere da solvente per altri cancerogeni, a seguito di un'azione irritativa e di disidratazione della mucosa [23]. Questo meccanismo giustificerebbe l'effetto oncogeno sinergico svolto da alcol e tabacco, tuttavia non risulta ancora chiara l'azione dell'alcol come fattore di rischio indipendente.

Human Papilloma Virus (HPV)

Il ruolo dell'HPV nel processo di cancerogenesi orale risulta essere molto controverso. HPV sono piccoli virus a DNA a replicazione intracellulare, epitelio-tropici e specie-specifici, recentemente inseriti nella nuova famiglia dei *papillomaviridae* [24]. Finora sono stati

definitivamente caratterizzati oltre 100 genotipi virali i quali, in relazione al loro potenziale oncogeno, sono stati ripartiti in due gruppi: High Grade HPV (HR HPV; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 82) associati alle lesioni potenzialmente maligne e Low Grade HPV (LR HPV; 2,4, 6, 11, 13, 32, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) associati più comunemente alle manifestazioni benigne (verruche volgari, condilomi, iperplasia epiteliale focale, papillomi squamocellulari, papillomatosi di Bowen) [25]. Il meccanismo oncogenetico si manifesta mediante i trascritti proteici derivati da HPV, soprattutto le oncoproteine E6 e E7 degli HR HPV che, interagendo con le cellule ospiti, vanno ad influenzare il differenziamento epiteliale e inibiscono la funzioneregolatoria degli oncosoppressori p53 e pRb nella replicazione cellulare [26].

L'oncogenicità HPV-relata è stata ampiamente documentata in ambito ginecologico ove il virus è considerato il principale agente eziologico del carcinoma della cervice uterina (80-90% dei casi di carcinoma presentano infezione da HPV 16-18)[27-28], unitamente alle osservazioni relative alle similitudini istologiche tra la mucosa buccale e la mucosa vaginale [29].

L'associazione tra HPV e CSO risulta invece essere controversa. C'è una parte di letteratura che ha mostrato una aumentata presenza di HPV in CSO e nelle lesioni potenzialmente maligne del cavo orale rispetto alla mucosa normale, con una prevalenza per i genotipi virali 16 e 18[30-36]. Dall'altra parte una consistente parte di studi hanno dimostrato che l'associazione tra HPV e CSO risulterebbe rara[37-39]. Risultati così contrastanti possono essere giustificati dalle diverse tecniche di campionamento (biopsie, saliva, brushing) e di rilevamento delle sequenze geniche virali (Southern BlotHybridization, Dot BlotHybridization, Polymerase Chain Reaction) [36], nonché dalla casistica di numerosi lavori che raggruppano insieme Carcinomi del Cavo Orale anteriore e Carcinomi dell'Oro-faringe. Negli ultimi anni sta infatti emergendo che questi due tumori, pur presentandosi in spazi anatomici vicini e comunicanti, abbiano aspetti biologici totalmente differenti [40]. In attesa che si faccia maggiore chiarezza in tal senso, l'accertamento dell'infezione orale da HPV non va contemplato nell'ordinario management del paziente a rischio, e deve esclusivamente essere considerato a scopo di ricerca.

Altri fattori

Gli altri fattori sono più che altro condizioni a livello locale e sistemico che possono favorire l'insorgenza del tumore e che vengono identificate come co-fattori in quanto causano l'indebolimento delle mucose, danneggiandole e consentendo una più rapida evoluzione da lesione precancerosa a carcinoma in situ, fino allo sviluppo di una neoplasia invasiva vera e propria. Queste situazioni possono essere malocclusioni, otturazioni o protesi incongrue, cattiva igiene orale, carenze alimentari (disvitaminosi A e C, interferiscono con il turnover cellulare), sostanze e cibi irritanti, traumi, malattie dell'apparato stomatognatico di tipo ereditario (Discheratosi Congenita) virali, batteriche o fungine (Candidosi), stati di immunosoppressione (congenita o acquisita).

SCOPO DEL PROGETTO DI DOTTORATO

Il progetto di dottorato si è sviluppato attorno a due aspetti fondamentali nella gestione del paziente affetto da CSO: la diagnosi precoce e la gestione del paziente affetto da seconde manifestazioni tumorali.

Ad oggi, una diagnosi precoce di CSO si ottiene in meno della metà dei casi. Solo se il carcinoma è diagnosticato in fase precoce, la sopravvivenza a 5 anni raggiunge l'80-90%, mentre scende al 5-20% in caso di diagnosi in fase avanzata [41]. Il ritardo diagnostico obbliga il ricorso a terapie estremamente invasive che determinano anche una scarsa qualità della vita residua.

Il paziente trattato per CSO nel 10-30% dei casi può presentare seconde manifestazioni tumorali che hanno un forte impatto sulla prognosi, anche quando la diagnosi avviene precocemente [42]. Le seconde manifestazioni tumorali si dividono in Recidive Locali (RL), se derivano da cellule del tumore primitivo, e Secondi Tumori Primitivi (STP), se invece risultano eventi indipendenti rispetto al tumore primitivo.

Scopo del presente lavoro di dottorato è stato:

1. Mettere a punto una metodica di prelievo non invasiva di facile utilizzo, economica in grado di identificare dei profili di espressione genetica ed epigenetica caratteristici di CSO e di lesioni ad alto rischio di trasformazione maligna. Analizzare il ruolo della proteina p16^{INK4A} come marker prognostico e come marcatore della presenza del virus HPV in LPM.
2. Valutare la presenza di marker istologici predittivi di comparsa di RL e STP e utilizzare una metodica di biologia molecolare in grado di fornire informazioni aggiuntive nei casi in cui criteri clinici e istologici non siano sufficienti per differenziare correttamente una RL da una STP.

PARTE 1: DIAGNOSI PRECOCE

INTRODUZIONE

LESIONI POTENZIALMENTE MALIGNI DEL CAVO ORALE

Il CSO nel 60-80% dei casi è preceduto da quadri clinici e istologici che vengono definiti come Lesioni Potenzialmente Maligne (LPM) [43]. L'aspetto clinico più comune è quello di macchie bianche e/o rosse. La riduzione di morbilità e mortalità per il CSO dipende in gran parte dal riconoscimento e dal trattamento delle Lesioni Potenzialmente Maligne (LPM).

In un recente workshop dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), tenutosi nel 2005, è stata discussa la definizione e la classificazione delle lesioni orali con una predisposizione alla trasformazione maligna [44].

Sono state definite come Lesioni Potenzialmente Maligne (LPM) quelle alterazioni morfologiche della mucosa orale in cui l'insorgenza di un CSO è molto più frequente rispetto al tessuto sano circostante, preferendo il termine di LPM a lesioni "preneoplastiche".

Fanno parte di questo gruppo la leucoplachia, con tutte le sue varianti cliniche, il Lichen Planus Orale (LPO) e anche la fibrosi sottomucosa, anche se quest'ultima è tipica esclusivamente delle popolazioni orientali dove si è soliti masticare la foglia di quid [20].

LEUCOPLACHIA

Il termine leucoplachia definisce, secondo le più recenti linee guida internazionali, una placca bianca della mucosa orale con probabile rischio di trasformazione maligna, avendo escluso patologie note e altri disordini che non hanno in sé un rischio di trasformazione maligna [44].

Si tratta quindi di una diagnosi di esclusione e anamnesi, esame clinico obiettivo ed esame istologico permettono di ottenere diagnosi differenziale. Nella TABELLA 1 vengono riportate le principali lesioni che possono entrare in diagnosi differenziale con la leucoplachia orale.

LESIONE	CRITERIO PER DIAGNOSI
Ustione da aspirina	Anamnesi con riscontro di applicazione topica di aspirina
Candidosi pseudo membranosa	Clinica
Candidosi cronica iperplastica	Istologia
Cheratosi frizionale	Clinica
Leucoplachia capelluta	Anamnesi e istopatologia (virus EpsteinBarr)
Leucoedema	Clinica
Linea alba	Clinica
Lupus eritematoso	Anamnesi e Istologia
Lichen Planus Orale	Clinica e Istologia
Papillomi	Clinica e Istologia
Sifilide secondaria	Anamnesi (sierologia) e clinica
Stomatite nicotinic	Anamnesi e clinica
White SpongeNevus	Clinica e istologia
Morsicatiobuccarum	Anamnesi e clinica

Tabella 1

I più recenti studi riportano una prevalenza della leucoplachia compresa tra lo 0,2% e il 5% con una predilezione per il sesso maschile ed un'età di insorgenza intorno ai 40 anni. I dati sulla percentuale di trasformazione maligna sono abbastanza variabili, con valori che vanno dallo 0% al 38% e un tasso annuale di trasformazione dell'1% circa [45].

Sede e Clinica

La leucoplachia può insorgere in qualunque sede del cavo orale, la zona più frequente sembra essere la mucosa geniena e la zona retrocommessurale. Zone meno interessate sono la zona del pavimento orale e i margini linguali, anche se è bene notare come lesioni situate in queste sedi sono quelle che presentano una maggiore tendenza alla trasformazione maligna[46]. Possono essere uniche o multiple e presentare le più diverse dimensioni e forme.

Dal punto di vista clinico si possono riconoscere 2 tipi principali di leucoplachie: **leucoplachie omogenee** e **leucoplachie non omogenee**. Le prime sono caratterizzate da un colore bianco uniformemente distribuito e non rilevate rispetto alla mucosa circostante. Nelle leucoplachie

non omogenee possono essere frammiste aree bianche e rosse, con possibile presenza di aree di erosione. L'eritroplachia è una variante clinica di colore rosso, rara, ma con un rischio molto elevato di evoluzione neoplastica [47]. Un altro tipo di lesione non omogenea è la leucoplachia verrucosa il cui colore è omogeneo ma la superficie è rilevata e verrucosa [48]. La leucoplachia Verrucosa Proliferativa (LVP) è infine un sottotipo di leucoplachia verrucosa caratterizzata da lesioni diffuse [49], resistenti alla terapia e con un alto rischio di trasformazione maligna [50-51]. Le lesioni non-omogenee sono quelle a maggior rischio di trasformazione maligna anche se tutte le leucoplachie devono essere sottoposte ad un accertamento biotico al fine di stadiare la lesione.

Istologia

Da un punto di vista istologico la leucoplachia non ha un aspetto specifico, ma è possibile osservare quadri microscopici diversi, varianti da una semplice ipercheratosi sino ai precursori del carcinoma (displasia) ed al carcinoma in situ. La presenza di displasia è ancora oggi il parametro maggiormente attendibile per identificare lesioni a rischio di trasformazione maligna, anche se l'assenza di displasia non può definire una lesione come non a rischio [52]. Sono riportate percentuali di trasformazione di lesioni con displasia del 16-36% [53]. La presenza di displasia moderata-grave può far raddoppiare il rischio di trasformazione maligna. Attualmente la classificazione dell'OMS del 2005 prevede 5 stadi istopatologici diversi per i precursori del CSO (TABELLA 2) [44].

Stadi istopatologici (OMS 2005)	Descrizione
Iperplasia Squamosa	- Anormale grado di cheratinizzazione (orto/paracheratosi)
Displasia lieve	- Atipia architetturale e citologica confinata allo strato basale e parabasale
Displasia moderata	- Modificazioni atipiche con mitosi e discheratosi nello strato spinoso
Displasia grave	- Modificazioni cito/architetturali con mitosi atipiche fino agli strati superficiali
Carcinoma in situ	- Modificazioni atipiche a tutto spessore

Tabella 2

Il gruppo di Ljubljana nel 2009 aveva inizialmente individuato delle criticità nella classificazione dell'OMS del 2005 (una difficoltà nell'andare a distinguere una iperplasia squamosa benigna rispetto ad una Displasia lieve, o una difficoltà nel distinguere una displasia grave rispetto ad un Carcinoma in situ) e già nel 2009 era stato proposto un differente sistema di suddivisione degli stadi istopatologici [54] (TABELLA 3).

Stadi istopatologici (Ljubljana 2009) [54]	Descrizione
Iperplasia Squamosa	<ul style="list-style-type: none"> - Epitelio iperplastico - Incremento dello strato spinoso - Strato basale /parabasale immodificato - Normale maturazione - Assente atipia cellulare - Infrequenti mitosi tipiche nello strato basale
Iperplasia basale/parabasale	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento dello strato basale/parabasale - Cellule basali perpendicolarmente orientate e strato spinoso orizzontale - Cellule parabasali con nuclei lievemente allargati - Mitosi tipiche rare negli strati basali - < del 5% di cellule discheratosiche
Iperplasia atipica	<ul style="list-style-type: none"> - Stratificazione ancora evidente - Aumento delle cellule con atipie nucleari e orientamento perpendicolare - Aumentato rapporto nucleo/citoplasmatico - Aumento delle mitosi principalmente nei 2/3 inferiori - Cellule discheratosiche ed apoptotiche
Carcinoma in situ	<ul style="list-style-type: none"> - Perdita di stratificazione o maturazione dell'epitelio superficiale - Marcate atipie cellulari - Mitosi anche atipiche in tutto l'epitelio - Cellule discheratosiche ed apoptotiche

Tabella 3

Nel 2014 6 esperti riconosciuti in ambito internazionale e tre patologi hanno proposto di sostituire la classificazione OMS 2005 e Ljubljana 2009 con un sistema binario che distingue lesioni a basso rischio (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions **LG SIL**) e lesioni ad alto rischio (High Grade Squamous Intraepithelia Lesions **HG SIL**), al fine di dare criteri morfologici più chiari e migliorare l'accordo interosservatore [55] (TABELLA 4).

Stadi istopatologici (Ljubljana 2014)[55]	Descrizione
Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LG SIL)	<ul style="list-style-type: none"> - Assenza di atipie cellulari - Cellule parabasali con nuclei lievemente allargati - Assenza di ponti intercellulari - Mitosi tipiche rare negli strati basali - < del 5% di cellule discheratosiche
High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HG SIL)	<ul style="list-style-type: none"> - Aumentato rapporto nucleo/citoplasmatico - Aumento delle mitosi principalmente nei 2/3 inferiori - Cellule discheratotiche ed apoptotiche nell'intero epitelio

Tabella 4

LICHEN PLANUS ORALE

Il lichen planus è una malattia mucocutanea cronica che presenta come meccanismo patogenetico una reazione autoimmunitaria di tipo cellulo-mediato contro le cellule dello strato basale [56].

Il Lichen Planus Orale (LPO) è una delle patologie più comuni nella mucosa del cavo orale e la prevalenza nella popolazione è circa dell'1-2%, senza particolari distinzioni o predilezioni razziali, ma con una prevalenza del sesso femminile [57]. L'interessamento cutaneo è molto più raro ed è solitamente auto-limitante mentre le lesioni orali sono croniche e raramente vanno incontro a remissione.

Ad oggi esiste invece evidenza scientifica che le lesioni orali da LPO sono il risultato di numerose e differenti manifestazioni patologiche con lo stesso meccanismo patogenetico e con differenze importanti per quanto riguarda l'agente eziologico [48].

Si tratta di lesioni con aspetti clinici quanto mai vari (bianchi, rossi, ulcerativi e più raramente bollosi) associati ad alterazioni istologiche che si identificano nell'infiltrato lichenoidale, cioè un infiltrato infiammatorio prevalentemente linfocitario situato al di sotto della membrana [58-59].

La presenza di una distribuzione bilaterale e simmetrica delle lesioni suggerisce una vasta e ampia distribuzione del self-alterato e chiama in gioco fattori che intervengono all'interno del cavo orale nella sua interezza. Sono queste le lesioni che oggi si attribuiscono al LPO

Classico e che paiono essere la conseguenza di una estrema iper-reattività del paziente nei confronti di agenti sconosciuti localizzati a livello del cavo orale o anche cutaneo [60].

Al contrario, la presenza di lesioni in zone limitate e non bilaterali sono oggi classificate sotto la dizione di Lesioni Lichenoidi Orali (LLO) in cui rivestono maggiore importanza fattori causali ben definiti (materiali dentari, farmaci, traumi) che hanno portato ad una alterazione di alcuni antigeni self rispetto alla iper-reattività autoimmunitaria individuale [61].

In un recente workshop internazionale le LLO sono state poi suddivise a seconda dell'agente causale in: lesioni lichenoidi da contatto (OLCL, Oral Lichenoid Contact Lesions, in particolar modo amalgama indotte), lesioni lichenoidi indotte da farmaci (OLDR, Ora lichenoid Drug Reaction), lesioni lichenoidi in pazienti che hanno subito un trapianto allogenico di midollo osseo nel momento in cui le cellule del midollo trapiantato iniziano una reazione immunitaria verso l'ospite che le ha ricevute affetti (LLO da Graft versus Host Disease) [56, 62-63].

Esistono poi anche LLO in pazienti affetti da altre patologie con interessamento extra-orale sistemico (HCV positivi, lupus eritematosus, artrite reumatoide, tiroidite di Hashimoto) [64].

Il lichen è una patologia cronica e se non viene individuata la causa, raramente va incontro a remissione spontanea, ma presenta andamenti altalenanti per quanto riguarda la morfologia delle lesioni e la sintomatologia clinica [60].

Caratteristica ancora oggi molto controversa sembra essere la potenzialità del lichen di andare incontro a trasformazione maligna [65]. Effettivamente l'OMS ha incluso nel 1997 il LPO tra i disordini potenzialmente maligni [48], ma ancora non esistono studi affidabili in grado di quantificare la portata di questo rischio e se esso è significativamente più elevato rispetto alla popolazione generale [66].

Tre importanti studi retrospettivi indipendenti hanno indicato una percentuale di trasformazione maligna attorno all'1%, con un tasso di trasformazione dello 0,2-0,4% per anno [67-69].

Un discorso a parte meritano le LLO in pazienti con GvHD che hanno subito un trapianto di midollo, in cui l'incidenza di CSO è significativamente superiore rispetto alla popolazione generale [63].

Per quanto riguarda le cause della trasformazione non ci sono dati conclusivi: in un recente lavoro non è stata trovata correlazione con il fumo e la terapia corticosteroidica topica ma è stata ipotizzata una possibile correlazione con la positività con HCV [68], anche se al

momento solo due casi di cancerizzazione in paziente con LPO e HCV sono riportati in letteratura [70-71].

L'infiammazione cronica è stata associata a vari tipi di tumori ed è stato ampiamente riportato che l'infiltrato infiammatorio può essere un importante fattore di rischio per la cancerizzazione in malattie come la rettocolite ulcerosa, l'esofago di Barrett e la gastrite atrofica [72]. Recentemente è stato proposto di includere LPO in questo gruppo di malattie [73].

Clinica

Una lesione secondaria ad una reazione lichenoidale può assumere differenti aspetti clinici oltre che per distribuzione all'interno del cavo orale, anche per quanto riguarda la morfologia della lesione che può assumere aspetti bianchi-reticolari (striate, papulari, a placca), o rossi-atrofici/erosivi (erosioni, ulcere, bolle).

Le lesioni reticolari e papulari sono le manifestazioni cliniche più comuni e più caratteristiche con un aspetto di linee che si intrecciano e congiungono tra di loro (strie di Wickham), mentre le lesioni a placca possono essere confuse con lesioni leucoplasiche. I quadri reticolari, papulari o a placca, pur modificando di aspetto e arrivando in alcuni casi ad estendersi per l'intero cavo orale, raramente possono dare sintomatologia, e sembrano riflettere la forma quiescente della malattia.

Le lesioni atrofico-erosive invece sono spesso sintomatiche e l'epitelio assottigliato sembra riflettere la forma attiva della reazione lichenoidale [58, 74].

Secondo alcuni autori, i pazienti con lesioni atrofico-erosive presenterebbero un rischio più elevato, mentre per altri il rischio sembra essere indipendente dall'aspetto clinico [68, 75].

Le più frequenti localizzazioni delle lesioni sono la mucosa orale posteriore, il dorso della lingua, la gengiva e il vermiglio del labbro inferiore [76]. Nel circa 10% dei casi la reazione lichenoidale risulta confinata alla gengiva aderente dando un quadro definito "gengivite desquamativa" [77].

Istologia

Le caratteristiche cliniche delle lesioni lichenoidi, soprattutto quando si presentano in forma bilaterale e con i classici reticoli sono fortemente orientative per una diagnosi di LPO [76]. Tuttavia manifestazioni così caratteristiche si presentano in una bassa percentuale di casi per

cui è sempre raccomandata l'esecuzione di un esame istologico mediante prelievo biptico di una zona rappresentativa della lesione.

La diagnosi di "reazione lichenoidale" impone la presenza di un quadro istologico specifico, caratterizzato dalla presenza di un denso infiltrato infiammatorio disposto al di sotto dello strato basale e composto prevalentemente da linfociti, segni di interruzione dello strato basale, presenza di corpi di Civatte [59].

L'immunofluorescenza diretta indirizzata a mettere in evidenza depositi di fibrinogeno a livello della membrana basale o dei corpi di Civatte viene solitamente eseguita in presenza di quadri erosivi e/o bollosi sospetti per patologie bollose [78].

Uno dei maggiori problemi in tutti gli studi longitudinali atti a quantificare la probabilità di cancerizzazione nel tempo del LPO è la mancanza di criteri oggettivi che forniscano una diagnosi iniziale certa nei pazienti che hanno poi sviluppato un CSO.

Il problema si presenta soprattutto nelle LLO, quando cioè le lesioni sono isolate e l'esame istologico talvolta non è in grado di distinguere un infiltrato lichenoidale "aggressivo" tipico delle LLO, da un infiltrato linfocitario "di difesa" che si può riscontrare in alcune forme pre-neoplastiche quali le leuco/eritroplachie; in questi casi, è molto difficile una corretta diagnosi differenziale tra OLL e leuco/eritroplachia, e quindi, in caso di progressione neoplastica della lesione, è molto difficile stabilire se il tumore si sia sviluppato a partire da una lesione lichenoidale o da una leuco/eritroplachia [79]. Questa confusione nella diagnosi iniziale in lesioni poi esitate in tumori ha portato ad avere in letteratura dati molto discordanti. Alcuni autori considerano le LLO lesioni a bassissimo rischio di trasformazione maligna, sostenendo che le lesioni esitate in tumori sarebbero in realtà forme di leuco/eritroplachie misinterpretate, mentre altri riportano percentuali di rischio quasi sovrapponibili alle leuco/eritroplachie, con un rischio aumentato soprattutto per quadri di Displasia Lichenoidale (DL).

METODICHE DI PRELIEVO E MARKER PREDITTIVI PER LA DIAGNOSI PRECOCE NEL CSO

Ad oggi la biopsia incisionale è la procedura diagnostica più affidabile per studiare una lesione a rischio di trasformazione maligna; essa presenta però dei limiti. La biopsia è un esame invasivo che non sempre è agevole ed indicato da effettuare, per esempio in lesioni non sospette. Inoltre spesso nel cavo orale sono presenti lesioni molto ampie o multiple e per il sanitario non è facile individuare la zona più idonea per effettuare il prelievo bioptico, con il rischio di falsi negativi o comunque di arrivare a sottostimare la vera natura della lesione. Negli anni recenti sono state pensate procedure diagnostiche non invasive, di facile utilizzo ed economiche in grado di funzionare come test di primo livello per identificare lesioni realmente a rischio che necessitano di approfondimenti diagnostici ma nessuna ancora risulta affidabile e utilizzabile nella pratica clinica.

Un esempio di test di primo livello in campo oncologico è il pap-test mediante citologia esfoliativa per la diagnosi precoce del cancro della cervice uterina, un test validato da molti anni e che ha aiutato a ridurre di molto la mortalità per il cancro della cervice uterina. La citologia esfoliativa con analisi al microscopio è stata proposta come metodica di screening per il CSO, perché economica, non cruenta e di facile utilizzo in una zona anatomica di facile accesso; purtroppo è una metodica che nel cavo orale ha dato numerosi falsi negativi [80]. Altre metodiche sono state proposte per identificare precocemente il paziente a rischio di sviluppare un CSO o metodiche in grado di identificare aree più rappresentative di una LPM. Sono esempi di questo tipo le metodiche di chemiluminescenza o auto fluorescenza in grado di illuminare zone rappresentative di una lesione o metodiche che utilizzano il blu di toluidina, colorante vitale acidofilo che presenta affinità per zone con elevato contenuto di acidi nucleici, e che dovrebbe evidenziare le aree maggiormente rappresentative di una lesione. Una recente metanalisi ha però confermato come al momento nessuna metodica e tecnologia hanno mostrato un chiaro vantaggio per migliorare la diagnosi precoce del CSO [81].

Un secondo aspetto valutato negli ultimi anni al fine di migliorare la diagnosi precoce nel CSO è stato quello di individuare altri parametri oltre alla clinica e all'istologia per intercettare la lesione o il paziente a reale rischio. A tale scopo ci si è indirizzati verso lo sviluppo di metodiche di biologia molecolare, nel tentativo di evidenziare profili di espressione di marcatori molecolari predittivi di trasformazione maligna. Numerosi marcatori biologici sono stati proposti nel CSO, ma tutti con alcune limitazioni riguardo la loro affidabilità o la possibilità di un loro utilizzo routinario nella pratica clinica.

Qui di seguito vengono descritti alcuni dei marcatori proposti e studiati nel CSO:

p53

La p53 è considerata un tumor suppressor gene, in quanto la sua attività è in grado di arrestare la crescita delle cellule andate incontro a trasformazione tumorale.

È una proteina dal peso molecolare di 53 kDa, prodotta dal gene TP53 (posizionato sul braccio corto del cromosoma 17) ed associata alla cromatina e alla matrice nucleare. Il suo ingresso nel nucleo è mediato dal legame con alcune proteine dette "chaperonine", in particolare con la "heat shock protein" Hsp70. Un danno al DNA dovuto ad esempio a radiazioni ionizzanti, può attivare la p53, la quale blocca la progressione del ciclo cellulare nella fase G1, favorendone la riparazione. Se tale riparazione è produttiva, il ciclo cellulare può riprendere e la cellula sopravvive. Nel caso in cui il danno sia troppo esteso ed irreparabile, la p53 promuove l'apoptosi della cellula.

I danni al DNA vengono rilevati in particolari "tappe di controllo" (che sono due: una tra G1 e S e l'altra tra G2 e M) del ciclo cellulare mitotico. Quando ciò avviene la p53, dopo una iniziale fosforilazione nella parte N terminale, si attacca in maniera aspecifica al DNA; a questo punto, attraverso una successiva acetilazione la p53 si attacca finalmente a specifici siti del DNA e quindi si attiva. Una volta in grado di trascrivere essa stimola subito la produzione di una proteina Mdm2 attraverso la trascrizione sul gene omonimo; tale proteina si attacca all'N terminale formando un complesso p53-Mdm2 il quale, da una parte, inattiva la proteina e dall'altra trasporta la proteina fuori dal nucleo in attesa della sua degradazione (se non viene richiesto il suo utilizzo) che avviene nell'arco di circa 20-30 minuti.

Sempre all'interno del nucleo esiste una proteina (p14) in grado di legarsi all'Mdm2 e di liberare la p53. Quindi, istante per istante, la p53 è presente in tre differenti forme: una p53 appena prodotta dal gene e ancora inattiva; una forma legata all'Mdm2 e quindi inattiva ma in grado di esercitare la sua funzione attiva dopo distacco dall'Mdm2; una forma libera attiva detta wild p53(wp53).

Danni al DNA provocano generalmente un aumento di wp53 attraverso meccanismi di fosforilazione e acetilazione (partendo dalla p53 inattiva e libera), mentre stimoli oncogeni (myc, ras, ecc..) aumentano il wp53 attraverso una aumentata liberazione dal complesso p53/Mdm2 in seguito a stimolazione della p14.

Mutazioni a livello del gene TP53 sono tra le più comuni e studiate in campo oncologico e anche nel CSO. Mutazioni di TP53 sono state individuate nel 50-90% di casi di CSO [82-83] e

sono considerate come un evento precoce nel processo di cancerogenesi orale. Infatti diversi studi le hanno identificate nel 35-90% delle LPM [44, 84-87].

p16^{INK4A}

La delezione del braccio del cromosoma 9 è uno dei più comuni e precoci danni genetici nel processo di cancerogenesi del CSO [88-90]. L'oncosoppressore p16 è presente sul cromosoma 9p21 e la sua corrispondente proteina p16^{INK4A} è implicata nei meccanismi regolatori del gene pRb.

La proteina p16^{INK4A} appartiene alla famiglia degli inibitori di CDK, fu scoperta in un complesso che comprendeva PCNA, ciclina D e la chinasiciclina-dipendente CDK4. Successivamente si è chiarito che p16^{INK4A} è una subunità regolatrice negativa di CDK4 e di CDK6.

La p16^{INK4A} appartiene alla famiglia degli inibitori INK4, che non agiscono sul complesso ciclina-CDK, ma sull'enzima monomero CDK. L'inibitore si lega a CDK in una zona opposta rispetto al sito di legame per la ciclina, il legame con p16^{INK4A} provoca una distorsione dei vari domini dell'enzima, che non trovandosi più allineati rispetto all'asse di simmetria verticale, non permettono più alla ciclina di interagire con CDK.

La funzione di p16^{INK4A} come inibitore delle chinasiciclina-dipendenti lo configura come prodotto di un gene oncosoppressore in quanto in sua mancanza viene meno un controllo negativo sulla proliferazione cellulare.

L'inibizione del legame ciclina-CDK, infatti, impedisce la fosforilazione di pRb (ciclina che è stata osservata per la prima volta in cellule di RetinoBlastoma, da cui prende il nome), che resta così legato al fattore di trascrizione E2F, bloccando la crescita cellulare. In caso di malfunzionamento o mancanza di p16, pRb sarebbe sempre fosforilata e E2F costitutivamente attiva, portando a proliferazione cellulare incontrollata.

Una ridotta espressione di p16^{INK4A} con conseguente perdita di funzione è stata osservata in CSO [91-93], ma, paradossalmente nell'oncologia del cavo orale sono stati osservati anche alti valori di p16^{INK4A}, suggerendo che una sovraespressione di questa proteina possa essere implicata nella patogenesi di un sottogruppo di CSO [94-97].

Una sovra espressione di p16^{INK4A} è stata anche messa in relazione alla presenza del virus HPV, anche se, come spiegato precedentemente, la relazione tra CSO e HPV rimane controversa.

La relazione tra sovraespressione di p16^{INK4A} e presenza di HPV infatti è stata ampiamente riportata in lesioni displastiche e neoplastiche della cervice uterina, dove l'inattivazione funzionale della pRb è mediata dalla proteina HPV E7 con conseguente iperespressione p16^{INK4a} ed è un dato ritrovato in quasi tutti i casi [27-28]. Per quanto riguarda invece il cavo orale studi che hanno indagato la relazione tra alti valori di p16^{INK4A} e presenza di HPV hanno dato risultati contrastanti.

Epigenetica

Negli ultimi anni è diventato chiaro che l'inattivazione di un oncosoppressore non avviene soltanto per la comparsa di una mutazione o una delezione a livello genetico, ma può anche avvenire per una regolazione a livello epigenetico [98-99].

Per alterazione epigenetica si intende lo studio dei cambiamenti ereditabili nell'espressione genica che non sono causati da cambiamenti nella sequenza del DNA. Modificazioni chimiche a livello del DNA e delle relative proteine possono alterare l'espressione genica senza creare modifiche alla sequenza del DNA [100]. Una delle alterazioni epigenetiche maggiormente presenti e studiate in campo oncologico è la metilazione del DNA [99].

La metilazione avviene a livello delle Citosine, non in tutte le zone, ma nelle sequenze CpG (ovvero nel di nucleotide Citosina-Guanina separato da un gruppo fosfato) che si trovano preferenzialmente raggruppate (isole CpG) nella regione promoter di un gene. Queste citosine normalmente non risultano metilate e la metilazione porta ad una modifica della loro struttura che rende inefficace il legame con fattori di trascrizione nella regione promotrice, bloccando così l'espressione di alcuni geni. Il gruppo metile si lega alla citosina mediante l'azione dell'enzima metil-transferasi. I geni su cui avviene metilazione sono solitamente legati alla crescita cellulare, a meccanismi di riparazione del DNA, legami intracellulari e inibizione al processo di metastasi. Un'assenza di metilazione è solitamente legata ad un'elevata attività di trascrizione mentre un'ipermetilazione comporta un blocco del processo di metilazione [101].

Nella cancerogenesi classica per inibire l'azione di un oncosoppressore era necessaria una mutazione o una delezione di entrambi gli alleli. Recentemente è stato dimostrato che un gene può essere silenziato anche da un'alterazione eterozigote che avviene su di un singolo allele. Il tumore, in comune con malattie autoimmuni e invecchiamento, è così caratterizzato da un progressivo aumento di alterazioni epigenetiche [102].

L'ipermetilazione di isole CpG è stato frequentemente osservato in cellule mutate nelle quali non sono attivi i normali processi di apoptosi e spesso sembra essere associato con l'inibizione o la mutazione di alcuni oncosoppressori.

E' stato notato come un alterato stato di metilazione sia comune in numerosi tumori umani, anche se il meccanismo sottostante non è ancora chiaro [102].

Altri meccanismi epigenetici come l'acetilazione degli istoni, sono responsabili di un cambiamento dell'espressione genica ma la loro relazione con il processo di cancerogenesi al momento risulta meno descritto in letteratura rispetto al processo di metilazione.

Numerosi recenti lavori hanno investigato lo stato di metilazione genica nel CSO. È stato individuato anche un alterato stato di metilazione in tessuti adiacenti a CSO e in tessuti di LPM, ipotizzando quindi la metilazione del DNA come un evento precoce del processo di cancerogenesi [102-106].

Lavoro 1:

ANALISI DI METILAZIONE DEL DNA MEDIANTE METODICA DI PRELIEVO NON INVASIVO PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL CANCRO ORALE

Introduzione

Una caratteristica attraente delle alterazioni epigenetiche è che sembrano essere stabili e facilmente identificabili nei fluidi [107]. Alcuni autori hanno già studiato negli ultimi anni lo stato di metilazione di un gruppo di geni a partire da saliva o da prelievi ottenuti mediante brushing del cavo orale [108-113]. L'individuazione di uno o più marcatori in grado di differenziare una lesione neoplastica o ad alto rischio mediante una metodica di prelievo non invasiva come il prelievo di saliva o la citologia esfoliativa potrebbe permettere di avere un test di primo livello di facile esecuzione ed economico in grado di individuare il paziente ad alto rischio.

Per il presente lavoro è stato identificato un pannello di 7 geni (ZAP70, GP1BB, KIF1A, miR137, miR375, CDH1, p16/CDKN2A) che precedenti autori hanno dimostrato avere un alterato stato di metilazione in CSO [102, 109-112, 114-124]. Nel pannello di geni da studiare è stato anche incluso TP53, uno dei geni ampiamente studiati in campo oncologico, al fine di valutare se da cellule ottenute mediante brushing del cavo orale era possibile individuare mutazioni di TP53 e correlare tali mutazioni con lo stato di metilazione dei geni analizzati.

Scopo del presente lavoro è stato di mettere a punto una metodica di prelievo non invasivo come il brushing attraverso la quale individuare marcatori cellulari in grado di differenziare il paziente affetto da CSO o da lesione ad alto rischio di trasformazione maligna.

Materiali e metodo

Il prelievo brushing è stato effettuato in un gruppo di pazienti consecutivi che si sono presentati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, sezione di Scienze Odontostomatologiche, Università di Bologna, con sospetto di CSO e/o di LPM nel periodo tra Gennaio 2013 e Luglio 2014. Lesioni che presentavano una causa oggettiva come un trauma o lesioni aftose o infezioni non sono state incluse nella popolazione di studio. I prelievi brushing in tutti i casi sono stati eseguiti prima della biopsia incisionale necessaria per la diagnosi e la stadiazione di ogni lesione.

Metodica brushing: 2 differenti strumenti sono stati utilizzati come dispositivi per ottenere cellule esfoliate mediante metodica brushing: un softbrush [prodotto da RI.MOS. s.r.l.

Mirandola (MO)-Italy] e un Cytobrush [prodotto da GPS Mozzo (BG)-Italy]. I prelievi sono stati effettuati random da 3 differenti operatori, 2 operatori con esperienza superiore a 10 anni nel campo della patologia orale e un terzo operatore con esperienza <1anno nel campo della patologia orale e definito inesperto. Nei pazienti con sospetto CSO e LPM il prelievo brushing è stato effettuato su tutta la superficie della lesione per raccogliere cellule esfoliate. Il protocollo consisteva nel far fare al paziente un primo sciacquo con clorexidina allo 0,12%, successivamente si è andati a sfregare sulla superficie della lesione per 4-5 volte con movimenti di rotazione e di traslazione. Il protocollo ha previsto, in pazienti con sospetto CSO e LPM di prelevare cellule anche sulla mucosa contro laterale sana del paziente. Il brushing è stato sempre eseguito prima della biopsia incisionale e sempre prima dell'iniezione di anestetico locale. Nei controlli sani cellule esfoliate sono state prelevate in zone anatomiche corrispondenti a quelli dei pazienti affetti da CSO utilizzando lo stesso protocollo. Dopo il prelievo il cytobrush è stato posizionato in una provetta contenente una soluzione di 5 ml di ETANOLO. Per una valutazione quantitativa del campione ottenuto per tutti i prelievi è stata calcolata la concentrazione di DNA mediante il fluorimetro Qubit (Life Technologies) utilizzando il kit The Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit seguendo il protocollo del fornitore. In 5 prelievi scelti casualmente le cellule esfoliate sono state anche fissate su vetrino per poter eseguire una valutazione morfologica delle cellule prelevate.

Dopo esame clinico e istologico, la popolazione di studio era così composta: 11 pazienti con diagnosi di CSO, 9 pazienti con diagnosi di HG SIL, 9 pazienti con diagnosi di LG SIL, 9 pazienti con diagnosi di LPO e 8 pazienti sani come gruppo di controllo.

L'esame istologico per la diagnosi e la stadiazione di ogni lesione è stato eseguito presso la sezione di Anatomia Patologica, Ospedale Bellaria, struttura afferente allo stesso Dipartimento. Tutti i casi sono stati esaminati dallo stesso anatomo-patologo (MPF). La diagnosi istologica è stata eseguita secondo i criteri OMS. La distinzione tra HG SIL di alto grado e LG SIL di basso grado è stata effettuata in accordo con la classificazione di Ljubljana del 2014 [55]. La diagnosi di LPO si è basata sulle caratteristiche cliniche della lesione: bilaterale e simmetrica con presenza delle strie di Wickham. Il quadro istologico era invece caratterizzato da infiltrato flogistico cronico nel chorion, composto prevalentemente da linfociti maturi, che aggrediscono lo strato basale dell'epitelio (interruzione della membrana basale), in cui si rilevano aspetti di degenerazione dei cheratinociti (corpi apoptotici, di Civatte o cellule con citoplasma vacuolizzato), senza displasia [56, 59, 125].

La TABELLA 5 raccoglie le caratteristiche cliniche e istologiche della popolazione di studio.

	n.	Sesso	Media età	Fumo	Sede	Presentazione clinica
CSO	11	8 M, 3 F	65,23±10,04	4 Si 7 No	2 Guancia 4 Gengiva 4 Lingua 1 Pavimento	4 proliferante (bianco) 5 ulcerato 2 verrucoso (bianco)
HG SIL	9	5 M, 4 F	73,75±11,41	2 Si 7 No	2 Gengiva 6 Lingua 1 Pavimento	3 bianco 5 rosso 1 verrucoso (bianco)
LG SIL	9	4 M, 5 F	66,77± 9,09	2 Si 7 No	4 Guancia 3 Gengiva 2 Lingua	7 bianco 2 verrucoso (bianco)
LPO	9	4 M, 5 F	64,87±11,54	2 Si 7 No	9 Guancia	8 lesione reticolare (bianca) 1 lesione atrofica (rossa)
Controlli	8	4 M, 4 F	60,35±7,87	4 Si 4 No	2 Guancia 2 Gengiva 3 Lingua 1 Pavimento	
TOT	46	25 M, 21 F	66,75±10,81	14 Si 32 No		

Tabella 5

Estrazione DNA

Il DNA ottenuto dai brushing è stato purificato utilizzando il Kit MasterPure™ (Epicentre, Madison, WI). Il trattamento con bisolfito del DNA è stato effettuato mediante il kit EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (ZymoResearch Europe, Freiberg, Germany) seguendo tutte le indicazioni del produttore.

Preparazione delle library

Ampliconi locus-specifici per il trattamento con bisolfito sono stati ottenuti mediante PCR usando la High Fidelity FastStartTaq DNA polymerase (Roche, Basel Swiss). Le condizioni per la prima PCR sono state: incubazione iniziale a 95° C per 3 minuti seguite da 35 cicli a 95° C per 30 sec, annealing a 55°C per 45 sec, e elongation a 72° C per altri 30 sec. Un passaggio finale a 72° C per 5 minuti è stato aggiunto alla fine dell'ultimo ciclo. I prodotti di amplificazione per ogni campione sono stati diluiti 1:100 in acqua distillata e utilizzati per la seconda PCR di barcoding. A questo proposito gli adattatori x 454 e i MID (multiplex identificatori) sono stati aggiunti in questo secondo passaggio utilizzando l'enzima Phusion Hot Start II High Fidelity DNA polimerasi (ThermoScientific, Pittsburg, PA) per ridurre gli errori di allineamento a 54° C. Gli ampliconi ottenuti sono stati purificati usando AgencourtAMPure XP beads (BeckmanCoulter, Krefeld, Germany), poi quantizzati usando

FluorometerQuantus™ (Promega, Madison, WI). Le library sono state diluite, unite e amplificate clonalmente in una PCR di emulsione (emPCR). Il sequenziamento è stato ottenuto utilizzando il Sequenziatore 454 GS della Roche in accordo con il protocollo del produttore (Roche emPCRAmplification Method Manual - Lib-A and Roche Sequencing Method Manual). Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software AVA (AmpliconVariant Analyzer, Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Per identificare le isole CpG nella regione promotrice dei geni ZAP70, GP1BB, KIF1A, MIR137, MIR375, CDH1, p16/CDKN2A le sequenze genomiche sono state ottenute a partire dal browser Ensemble genome (<http://www.ensembl.org/index.html>), considerando 1000 bp a monte del codone ATG. Il disegno di MethPrimer(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) è stato utilizzato per convertire ciascuna citosina in timina e identificare ogni CpG, oltre a ottenere le migliori combinazioni di primers. TABELLA 6

PRIMER NAME	SEQUENCE INCLUDING UNIVERSAL A AND B AT 5' -
ZAP70FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-TATTGTGGATYGGTAGAGTTTTG
ZAP70 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-CTCTCACCTCCAACCTTCCA
GP1BB FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-TTGTTTTGGTGATAGGAGAATAATG
GP1BB REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-ACCTAACCAAAAAATAACCCAAAAAC
KIF1A FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-ATAAATTAGTTGGYGATTGGAGTT
KIF1A REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-CCCCRCATAAACTAACATAAA
MIR137 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT- TTTAGGTAGGGYGGGTTTA
MIR137 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-CCCCCTACCRCTAATACTCTC
p16/CDKN2A FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-GAGGGGTGGTGGTTATTAGA
p16/CDKN2A REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-TACAAACCTCTACCCACCTAAAT
MIR375FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-AGGGTGGTTGGGAAAGGAG
MIR375 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-ACCCCGAACTAATACTAAAAAAC
CDH1 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-TAGTAATTTTAGGTTAGAGGGTTAT
CDH1 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-AAACTCACAAATACTTTACAATTCC
TP53 EX4-5' FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-CCTGGTCCTCTGACTGCTCT
TP53 EX4-5' REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-TTCTGGGAAGGGACAGAAGA
TP53 EX4-3' FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-CTGGCCCTGTCTCTTCT
TP53 EX4-3' REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-GCCAAAGGGTGAAGAGGAAT
TP53 EX5 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-CACTTGTGCCCTGCTCTCT
TP53 EX5 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-AACCAGCCCTGTCTCTCT
TP53 EX6 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-GAGAGACGACAGGGCTGGT
TP53 EX6 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-GAGACCCAGTTGCAAACC
TP53 EX7 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-CTTGGGCCTGTGTTATCTCC
TP53 EX7 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-GGGTCAGAGGCAAGCAGA
TP53 EX8 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-TTTCCTTACTGCCTCTTGCTTC
TP53 EX8 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-GCTTCTTGTCTCTGCTTGCTT
TP53 EX9 FORWARD	GTAATACGACGGTCAGT-AGGGTGCAGTTATGCCTCAG
TP53 EX9 REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC-AAGAAAAACGGCATTTTGAGTG
ADAPTOR UNIVERSAL TAIL A LINKED TO MID2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACA- GTAATACGACGGTCAGT
ADAPTOR UNIVERSAL TAIL B LINKED TO MID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACG- CAGGAAACAGCTATGAC

I file SFF sono stati utilizzati come sorgente per generare ciascuna sequenza in FASTA e FASTQ tramite PERL. Le sequenze di ogni paziente sono state attribuite riconoscendo i vari MID. E' stato calcolato il coefficiente di conversione tramite trattamento con bisolfito

ottenendo in media più del 99% di conversione da C a T. Infine è stata così calcolata la percentuale totale di isole CpGs metilate in ogni gruppo mediante il software QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp/>).

Analisi di mutazioni di TP53: l'analisi di mutazioni di TP53 è stata effettuata mediante piattaforma GS Junior 454 usando i primer riportati nella tabella e analizzando gli esoni 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Le condizioni per il primo ciclo di PCR specifica sono state le seguenti: incubazione iniziale a 98 C per 3 minuti seguita da 30 cicli di 10 sec, 61° C per 20 sec e 72° C per 20 sec. Un passaggio finale a 72° C per 5 minuti è stato aggiunto alla fine di ogni ciclo. Le stesse condizioni sono state usate per un secondo passaggio di PCR per il barcoding eccetto che per l'allineamento a temperatura di 54° C. Le reads processate e filtrate sono state analizzate con il GS AmpliconVariant Analyzer (AVA) versione 2.7 (454 Life Sciences).

Analisi statistica

1. Metodica brushing

ANOVA a una via per valutare quantitativamente la concentrazione del DNA nei prelievi brushing in relazione a sede del prelievo, aspetto clinico della lesione, tipologia di lesione, fumo e in relazione al tipo di strumento utilizzato e all'operatore che ha eseguito il prelievo.

2. Analisi di metilazione

È stata calcolata la percentuale di isole CpG metilate in ogni campione per ogni gene selezionato dal software QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp/>). È stato così comparato il pattern di metilazione di ogni lesione rispetto sia al pool di donatori sani che rispetto alla corrispettiva mucosa sana controlaterale. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test di Mann-Whitney. Un P value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. I risultati di metilazioni ottenuti sono stati dicotomizzati (Es. assenza di alterata metilazione vs. iper- o ipometilazione). Test del Chi quadrato per valutare ogni possibile differenza fra i diversi gruppi di lesioni nel pattern di metilazione di ognuno dei 7 geni testati.

Test del Chi quadrato è stato eseguito per valutare ogni possibile relazione tra le mutazioni di TP53 in ogni gruppo di lesione e lo stato di metilazione di ognuno dei geni.

Risultati

Popolazione di studio e prelievi con Metodica brushing

La popolazione di studio totale è composta da 46 pazienti (25 M, 21 F età media $66,75 \pm 10,81$), 38 pazienti con sospetto CSO e/o LPM più 8 pazienti sani. È stato eseguito un doppio prelievo (lesione+sano) nei pazienti con sospetto CSO e/o LPM, per arrivare ad un totale di 86 $[(38 \times 2) + 8]$ prelievi brushing effettuati. Per ognuno dei prelievi brushing sono stati valutati: lo stato di metilazione di 7 geni e l'analisi di mutazione di TP53 per un totale di 688 (86×8) geni analizzati al NGS. In 42/688 geni (6,1%) non è stato possibile eseguire sequenziamento per un'insufficiente quantitativo di DNA o per problemi di sequenziamento. Per ogni prelievo è stato calcolata la concentrazione di DNA. Si è ottenuto un valore medio di $26,96 \pm 28,11$ ng/ul.

L'analisi statistica ANOVA a una via ha messo in evidenza come l'unica variabile statisticamente correlata alla quantità di DNA ottenuto dal prelievo è il tipo di strumento utilizzato. In particolare si sono ottenute concentrazioni maggiori di DNA utilizzando il Cytobrush rispetto al softbrush ($F:3,83$ $p < .05$). GRAFICO 1

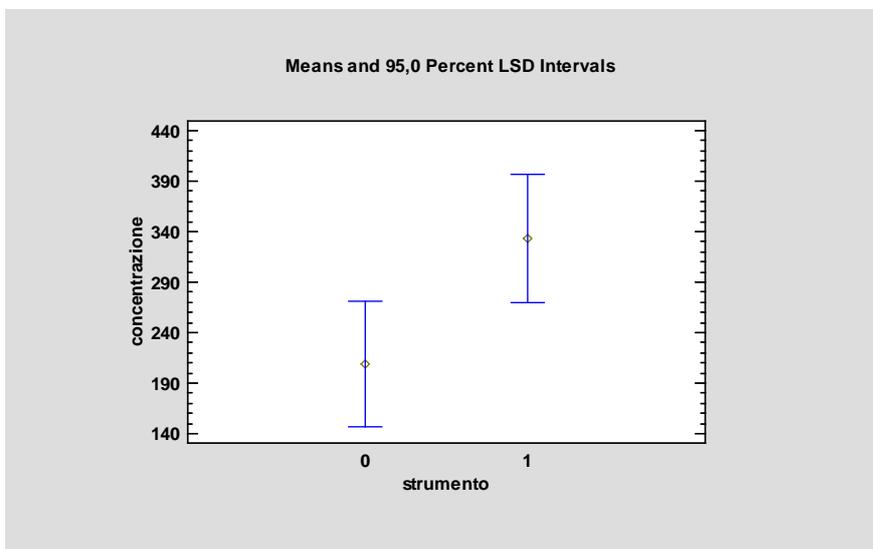


Grafico 1

In TABELLA 7 sono riassunti i risultati per le variabili analizzate.

	Concentrazione media	P value
Sede del prelievo (guancia vs. lingua vs. palato e gengiva)	Guancia= 24,8 ng/ul Lingua= 39,5 ng/ul Gengiva palato= 25,9 ng/ul	0.3
Aspetto clinico (lesioni bianche o proliferanti vs. lesioni rosse o ulcerate)	Lesione bianca o proliferante= 28,5 ng/ul Lesione rossa o ulcerata= 23,9 ng/ul	0.8
Fumo (fumatore vs. non fumatore)	Fumatore= 25,8 ng/ul Non fumatore= 28,2 ng/ul	0.7
Mucosa cavo orale (lesione vs. sano)	Lesione= 27,0 ng/ul Sano= 26,8 ng/ul	0.9
Tipo di Patologia (CSO vs. HG SIL vs. LG SIL vs. LPO)	CSO= 39,9 ng/ul HG SIL=22,9 ng/ul LG SIL= 30,3 ng/ul LPO=12,2 ng/ul	0.1
Tipo di strumento (cytobrush vs. softbrush)	Cytobrush= 33,3 ng/ul Softbrush= 20,9 ng/ul	0.05*
Operatore (esperto vs. inesperto)	Esperto1= 30,8 ng/ul Esperto2= 26,3 ng/ul Inesperto= 22,2 ng/ul	0.4

Tabella 7

L'analisi morfologica dei vetrini è stata effettuata su 3 LPO, 1 HG SIL e 1 CSO e in tutti i casi ha evidenziato la netta prevalenza di cheratinociti dello strato superficiale.

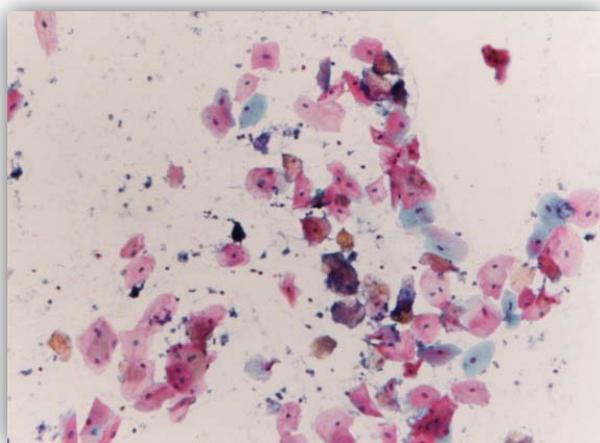


Figura 3: caso GP, esempio di citologico di LPO (è possibile notare la presenza di cheratinociti dello strato superficiale)

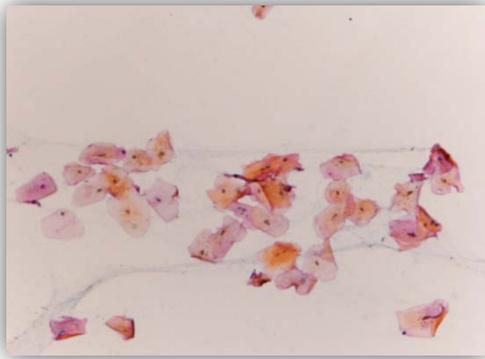


Figura 4: caso DG, esempio di citologico di HG SIL (anche in questo casi sono stati raccolti cheratinociti superficiali)

Analisi di metilazione

Non ci sono state differenze di risultato in nessun caso nel confronto statistico del pattern di metilazione di ogni campione sia quando è stato confrontato con il gruppo di donatori sani sia quando è stato confrontato con i risultati ottenuti dalla mucosa sana contro laterale. I risultati sono riassunti nelle TABELLE 8, 9 e 10.

Pz.	Diagnosi istologica	GP1BB	ZAP70	KIF1A	miR137	miR323	CDH1	P16/CDKN2A	TP53
GC	CSO	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	NA	NA	Non meth	WT
NF	CSO	Non meth	Iper-	Non meth	NA	NA	NA	Non meth	WT
ZN	CSO	Ipo-	Iper-	Iper-	Iper-	NA	NA	Non meth	WT
BW	CSO	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	c.327_334delCCGTCTGG; p.F109fs*4
SA	CSO	Ipo-	Iper-	Non meth	Non meth	NA	NA	Non meth	WT
FG	CSO	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	WT
PB	CSO	Ipo-	Iper-	Iper-	NA	Non meth	Non meth	Iper-	c.725G>A; p.C242Y
GG	CSO	Ipo-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	c.639A>G; p.R213R
FA	CSO	Ipo-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
LF	CSO	Ipo-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	c.835_836insTCCTG; p.G279fs*2
FD	CSO	Ipo-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	c.743G>A; p.R248Q
11 CSO		10/11	11/11	5/11	4/9	0/7	0/7	1/11	5/11

Tabella 8

Pz.	Diagnosi istologica	GP1BB	ZAP70	KIF1A	miR137	miR323	CDH1	P16/CDKN2A	TP53
DBG	HG SIL	Non meth	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	WT
FA	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	NA	Non meth	WT
PA	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	c.743G>A; p.R248Q
MA	HG SIL	Ipo-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
GF	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
RA	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	NA	NA	NA	Non meth	WT
VF	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
MM G	HG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	WT
DA	HG SIL	Ipo-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	c.530C>G; p.P177R
MT	HG SIL	Ipo-	Iper-	NA	Non meth	Non meth	NA	Non meth	WT
DG	HG SIL	Ipo-	Iper-	Iper-	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	c.755T> C,p.L252P; c.699C>G, p.H233Q
11HG SIL		10/11	11/11	2/10	4/10	0/10	0/8	0/11	3/11
BE	LG SIL	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
CMR	LG SIL	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
BA	LG SIL	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
PF	LG SIL	Ipo-	Iper-	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	WT
MI	LG SIL	Non meth	Non meth	Iper	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
BV	LG SIL	NA	NA	Iper	NA	NA	NA	Non meth	c.639A>G; p.R213R
NA	LG SIL	Ipo-	Non meth	Iper	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	c.524G>A; p.R175H
CS	LG SIL	Ipo-	Iper-	Iper	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	c.473G>A; p.R158H
RMG	LG SIL	Non meth	Non meth	NA	Non meth	Non meth	Non meth	Non meth	WT
9 LG SIL		3/8	2/7	4/8	2/8	0/8	0/8	0/9	3/9

Tabella 9

Pz.	Diagnosi istologica	GP1BB	ZAP70	KIF1A	miR137	miR323	CDH1	P16/CDKN2A	TP53
CC	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
ME	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
GG	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
ZV	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
BC	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
TM	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
GP	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
LL	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
QE	LPO	Non meth	Non meth	Non meth	Iper-	Non meth	Non meth	Non meth	/
9 LPO		0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	

Tabella 10

Nessuno dei donatori sani è risultato avere uno stato di metilazione alterato per nessuno dei 7 geni selezionati nel presente studio e non ha mostrato mutazioni di TP53.

GP1BB è risultato ipometilato in 10/11 (90,9%) casi di CSO, in 8/9 (88,8%) casi di HG SIL, in 3/9 (33,3%) casi di LG SIL. Il gruppo di pazienti con CSO e con HG SIL hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto ai pazienti con LG SIL e ai confronti sani ($p < .01$). FIGURA 5-6-7

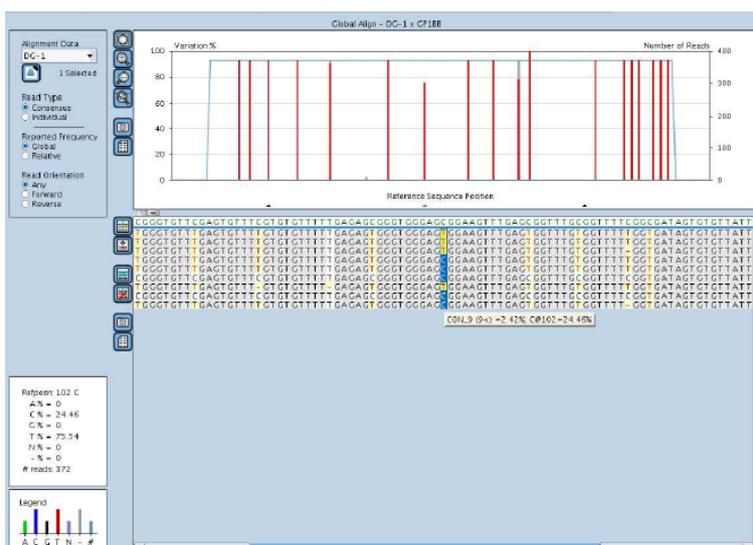


Figura5: Analisi di metilazione per il gene GP1BB nel caso DG (HG SIL). Lo stato di metilazione viene valutato calcolando il numero di conversione da C a T (il numero di C indica la presenza di citosine metilate mentre la presenza di T indica citosine non metilate). In questo grado il numero di C è pari al 24,2% che definisce un generale stato di ipometilazione

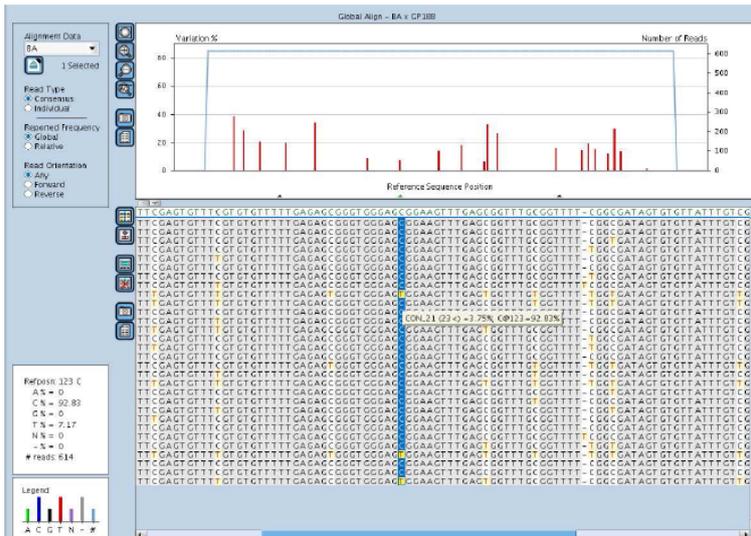


Figura 6: Analisi di metilazione per il gene GP1BB per la mucosa sana controlaterale del caso DG (HG SIL). La percentuale di C in questo caso è pari al 92%.

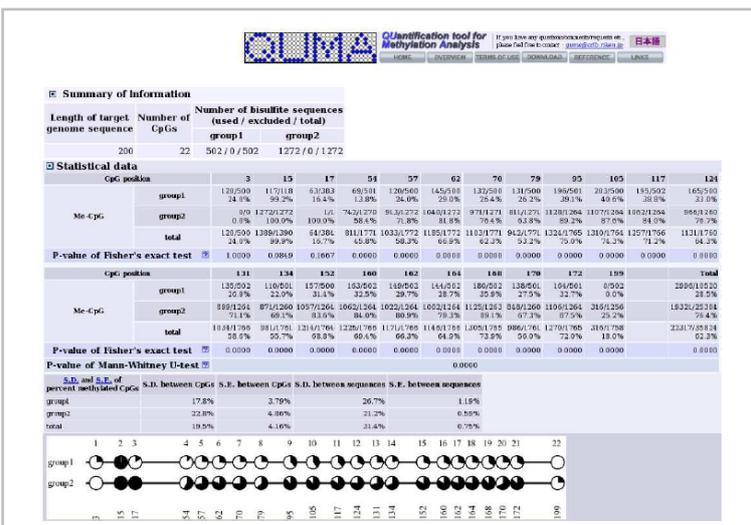


Figura 7: Analisi statistica mediante software QUMA per il gene GP1BB. Il p value ottenuto dal MainWhitney Test è stato utilizzato per confrontare lo stato di metilazione nel caso DG della lesione HG SIL rispetto al gruppo dei donatori sani. Sono state analizzate in questo caso 22 isole CpG ed è stata identificata una differenza statisticamente significativa tra lesione e gruppo di controllo ($p < .0001$)

ZAP70 è risultato ipermetilato in 11/11 (100%) casi di CSO, in 9/9 (100%) casi di HG SIL (100%), in 2/9 (22,2%) casi di LG SIL. Anche in questo caso il gruppo di pazienti con CSO e con HG SIL hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto ai pazienti con LG SIL e ai confronti sani ($p < .01$). FIGURA 8-9-10.

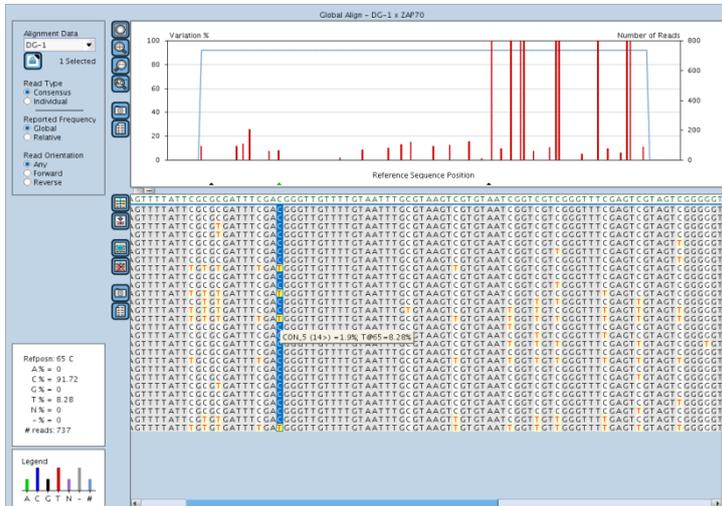


Figura 8: Analisi di metilazione per il gene ZAP70 nel caso DG (HG SIL). Il presente grafico mostra una percentuale del 91,72% di citosine metilate

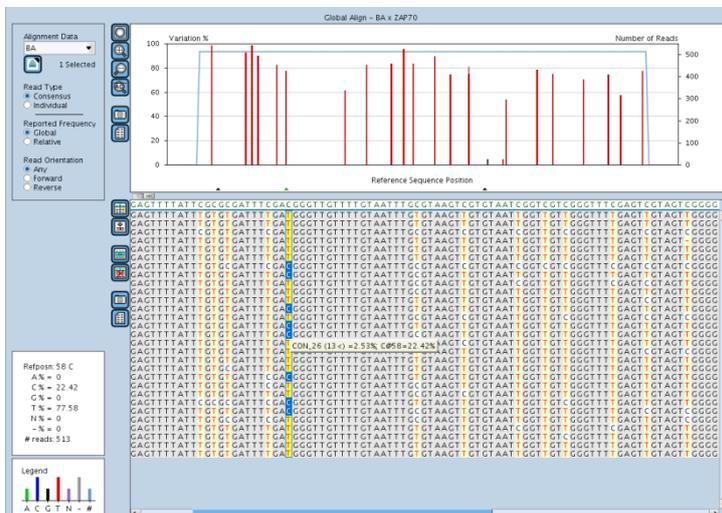


Figura 9: Analisi di metilazione per il gene ZAP70 in un donatore sano. Il presente grafico mostra la percentuale di C metilate risultate nel presente caso del 22,42%

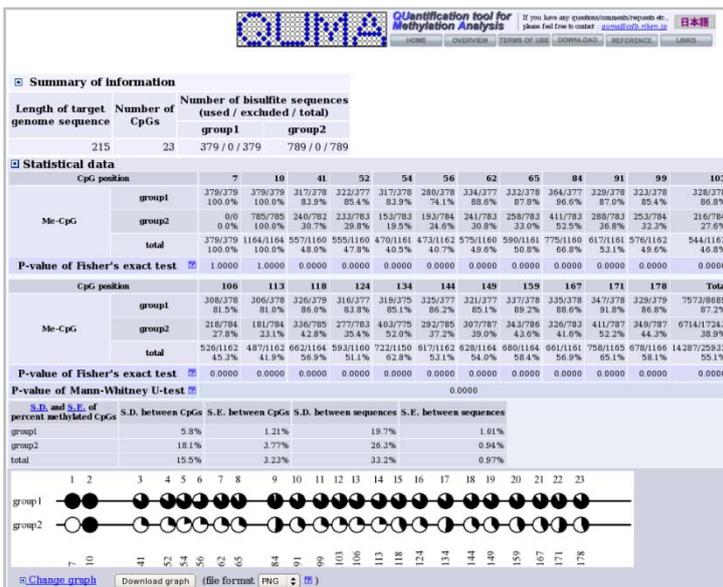


Figura 10: Analisi statistica mediante software QUMA per il gene ZAP70, nel caso DG(HG SIL) rispetto al gruppo dei donatori sani. Sono state analizzate in questo caso 23 isole CpG ed è stata identificata una differenza statisticamente significativa tra lesione e gruppo di controllo ($p < .0001$)

KIF1A è risultato ipermetilato in 5/11 (45,5%) casi di CSO, in 3/9 (33,3%) casi di HG SIL, in 4/9 (45,5%) casi di LG SIL. Per il gene KIF1A non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p=NS$).

miR137 è risultato ipermetilato in 4/11 (36,4%) casi di CSO, in 4/9 (45,5%) di HG SIL, in 2/9 casi di LG SIL. Anche per il gene miR137 non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p=NS$).

p16/CDKN2A è risultato ipermetilato solo in 1/11 (9%) caso di CSO. In nessuno degli altri campioni è stato identificato un alterato stato di metilazione.

miR323 e MGMT non presentato un alterato stato di metilazione rispetto al gruppo dei normali in nessuno dei campioni analizzati.

Per quanto riguarda il gruppo dei pazienti affetti da LPO l'unico gene con un alterato stato di metilazione è miR137, il quale è risultato ipermetilato in tutti e 9 i casi esaminati (100%).

Mutazioni per TP53 sono state rilevate in 5/11 CSO, 3/11 HG SIL e 3/9 LG SIL. Non sono state identificate differenze statisticamente significative (p=.ns). FIGURA 11

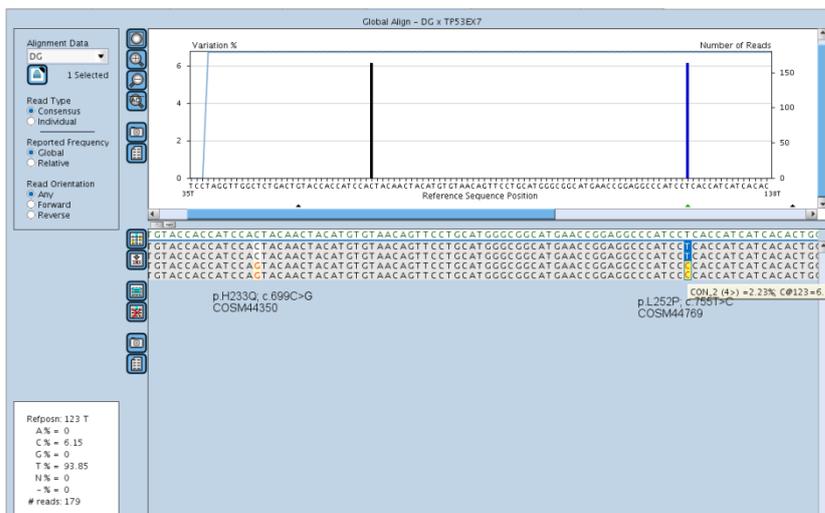


Figura 11: caso DG (HG SIL). Per quanto riguarda Tp53 sono state identificate 2 mutazioni in cis, identificate nella stessa reads con una frequenza del 6,15% p.H233Q and p.L252P. Entrambe le mutazioni sono state annotate in COSMIC database.

Infine, Il test del Chi quadrato ha mostrato un'associazione statisticamente significativa tra lo stato di ipermetilazione di KIF1A e le mutazioni di TP53 e tra lo stato di ipometilazione di GP1BB e TP53.

In tabella sono riassunti i dati relativi all'associazione tra mutazioni di TP53 e lo stato di metilazione di ZAP70, GP1BB, KIF1A, miR137. TABELLA 11

Geni	Chi quadrato	p value
ZAP70 e TP53	0,764	0.3
GP1BB e TP53	6,222	0.001*
KIF1A e TP53	11,95	0.0005*
miR137 e TP53	0,435	0.5

Tabella 11

Discussione

L'utilizzo di un test di primo livello in grado di identificare il paziente a rischio di CSO è una strategia affascinante per migliorare i dati relativi alla diagnosi precoce e alla sopravvivenza nel carcinoma orale.

L'identificazione di un alterato stato di metilazione del DNA mediante prelievo non invasivo è stato proposto nel presente lavoro come metodica per l'identificazione di CSO e Lesioni ad alto rischio di trasformazione maligna. Un alterato stato di metilazione di alcuni si è visto essere frequentemente presente nelle prime fasi del processo di cancerogenesi orale [102-106].

La metilazione del DNA avviene nella regione promotrice dei geni e alcuni geni possono contenere centinaia potenziali siti di metilazione. Lo sviluppo di metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), che possono generare milioni di reads ognuna corrispondente alla sequenza di una singola molecola di DNA, ha dato nuove opportunità al fine di avere un'approfondita analisi dello stato di metilazione della regione promotrice di un singolo gene.

La metodica mediante NGS, rispetto ad altre utilizzate come qMSP, che interroga solo poche isole CpG (max2-4 isole), presenta degli importanti vantaggi:

- Permette di analizzare un numero molto più elevato di isole CpG
- Le reads più lunghe possono essere più facilmente allineate rispetto alla sequenza di riferimento
- Le reads più lunghe permettono di dare più informazioni relativamente al genotipo, permettendo di avere informazioni tra il genotipo e lo stato di metilazione del DNA.

Tra gli svantaggi della metodica esistono ancora percentuali di errore relativamente alte in regioni con sequenze altamente ripetute.

Lo stato di metilazione di numerosi geni è stato già studiato in precedenti lavori come marcatori molecolari nella diagnosi e nella prognosi del CSO. Nel presente lavoro abbiamo selezionato un pannello di 7 geni (*GP1BB*, *ZAP70*, *miR137*, *miR375*, *MGMT*, *CDH1* e *p16/CDKN2A*) proposti recentemente da diversi autori [102, 109-112, 114-124].

Nel presente lavoro nessuno dei 7 geni è risultato avere un alterato stato di metilazione nei soggetti sani, soggetti non fumatori e presi con età simili rispetto all'età di comparsa del CSO.

Analizzando i campioni di CSO sono stati identificati 2 geni che sono risultati alterati in quasi tutta la casistica analizzata. In particolare *ZAP70* è risultato ipermetilato nel 100% dei casi e

GP1BB è risultato ipometilato in 10 casi su 11. Gli stessi geni sembrano avere un comportamento simile anche nelle SIL ad alto rischio (HG SIL). Infatti ZAP70 è risultato ipermetilato in tutte le HG SIL e GP1BB in 8 casi su 9, mentre nelle SIL a basso rischio (LG SIL) un'alterata metilazione si è avuta solo nel 22% e nel 33,3% dei casi.

ZAP70 e GP1BB sono 2 geni poco studiati nel CSO e nei tumori solidi in generale. ZAP70 è un gene che trascrive per una tirosinchinasi normalmente espressa dalle cellule natural killer e dai linfociti T. Un alterato stato di metilazione del gene ZAP70 è uno storico marker di prognosi sfavorevole nel Leucemia Linfatica Cronica [126-128]. Il gene GP1BB codifica per una proteina trans membrana che fa parte del recettore di von Willebrand ed è coinvolto nel meccanismo di adesione della circolazione arteriosa. Tale gene non è stato descritto in campo oncologico ma le sue mutazioni sono associate alla Sindrome di Bernard Soulier e altri rari disordini della coagulazione [129]. Nell'oncologia del cavo orale entrambi i geni sono stati descritti solo in un lavoro di Marsit et al. nel 2009. Il lavoro andava ad esaminare lo stato di metilazione in tumori testa collo a partire da prelievi fissati in formalina. ZAP70 e GP1BB erano risultati associati ad una prognosi infausta, suggerendone un possibile ruolo nei meccanismi di oncosoppressione [120].

Altri 2 geni che nella nostra popolazione sono risultati avere un alterato stato di metilazione in CSO e HG SIL sono KIF1A e miR137, anche se in questo caso i valori di sensibilità, specificità VPP e VPN sono risultati inferiori.

KIF1A (Kinesin Family member 1A) codifica per una proteina che è coinvolta nei meccanismi di trasporto e divisione cellulare [130]. In un recente lavoro Demokan et al. hanno identificato una ipermetilazione di KIF1A nel 98% di tessuti fissati in paraffina di pazienti affetti da CSO e nel 38% di campioni ottenuti a partire da saliva degli stessi pazienti [109]. Il nostro dato su CSO e HG SIL (rispettivamente 33,3% e 44,4%) risulta essere in linea con il risultato ottenuto su saliva da Demokan et al. E'interessante notare anche la presenza di una relazione statisticamente significativa tra stato di ipermetilazione di KIF1A e mutazioni di TP53. Il gene TP53 nel presente lavoro è stato analizzato come "controllo genetico" della validità della metodica. Infatti TP53 è uno dei geni maggiormente studiati nel CSO, risulta essere mutato nel 50% circa di pazienti affetti da tale neoplasia e compare nelle prime fasi di cancerogenesi. I risultati per TP53, nel nostro lavoro sono in linea con la letteratura mostrando come il gene sia mutato in 5 casi su 11 (45,5%) e compare in ben 3 casi su 9 di LG SIL (33,3%), quindi nelle prime fasi di cancerogenesi.

La relazione statistica esistente tra TP53 e KIF1A e tra TP53 e GP1BB è identificabile soprattutto nei pazienti con LPM (HG SIL e LG SIL), ma al momento non è stato riscontrato in nessun altro lavoro e non è ben chiaro il significato biologico di tale relazione.

L'ultimo gene che ha mostrato risultati interessanti è miR137. I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA lunghe 21-23 nucleotidi che regolano l'espressione di uno o più geni target a livello post-trascrizionale. In particolare miR137 sembra avere un ruolo nella differenziazione cellulare e nel controllo del ciclo cellulare, in particolare a livello del passaggio G1-S. Infatti ha un ruolo nella regolazione dell'espressione di Cdk6, implicato nei meccanismi di regolazione delle pRb.

I microRNA sono risultati essere metilati in numerosi tumori [131-133]. In particolare miR137 sembra essere ipermetilato in numerosi tipi di tumore tra i quali tumore dello stomaco [131], del colon [132] e CSO [133]. Langevin et al. hanno identificato una relazione tra ipermetilazione di miR137 e prognosi infausta in CSO. Inoltre è stato identificato a partire da fluidi biologici come la saliva [110]. Nei nostri dati miR137 è risultato ipermetilato nel 36,4% di CSO e nel 44,4% di HG SIL. È interessante notare come sia stato l'unico gene con un alterato stato di metilazione nel gruppo di pazienti affetti da LPO, tra l'altro con una sensibilità estrema risultando ipermetilato in tutti e 9 i casi analizzati. Nonostante Bediaga et al. in un recente lavoro del 2014 abbiano dimostrato come il fenomeno della metilazione sembra essere raro in pazienti affetti da lichen [108] e il nostro campione sia modesto come numero è interessante però notare come anche Dang et al. nel 2013 hanno individuato una ipermetilazione propria di miR137 in una popolazione di pazienti affetti da LPO [115]. Nel presente lavoro è stato analizzato anche lo stato di metilazione del gene p16, oncosoppressore ampiamente studiato nel CSO e anch'esso implicato nei meccanismi di regolazione di pRb. Diversi autori infatti avevano identificato il gene p16 ipermetilato in CSO e LPM. Nella nostra casistica p16 è risulta essere ipermetilato in un solo campione di CSO e in nessuno di LPM, compresi LPO.

Conclusioni

In conclusione, il nostro lavoro ha mostrato come l'analisi di metilazione del DNA mediante prelievo non invasivo e analisi NGS sembra essere una promettente e non invasiva metodica per individuare precocemente CSO e HG SIL. L'alterato stato di metilazione in particolare di 2 geni, GP1BB e ZAP70 rappresentano un marker sensibile e specifico per individuare CSO e HG SIL, anche se in un numero basso di pazienti, mentre miR137 è risultato essere un marker

specifico per pazienti affetti da LPO. I risultati dovranno essere validati su casistiche più ampie oltre a chiarire il ruolo funzionale dei geni ZAP70 e GP1BB in CSO e HG SIL e di miR137 in LPO. Se verranno confermati, si può ipotizzare che tale metodica possa essere utilizzata come per lo screening delle LPM del cavo orale.

Lavoro 2

ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA P16^{INK4A} COME MARKER PROGNOSTICO E COME INDICATORE DI INFEZIONE DA HPV IN PAZIENTI AFFETTI DA LPO.

Introduzione

L'oncosoppressore p16 è presente sul cromosoma 9p21 e la sua corrispondente proteina p16^{INK4A} è implicata nei meccanismi regolatori del gene pRb ed uno dei geni maggiormente studiati e analizzati nell'oncologia del cavo orale. Numerosi autori hanno identificato un'alterata espressione genica o un alterato stato di metilazione di p16 in CSO e LPM.

Riguardo l'espressione genica, in particolar modo rilevata mediante metodica di immunoistochimica, un recente lavoro effettuato dal nostro gruppo di ricerca ha mostrato come CSO che mostravano sovraespressione di p16^{INK4A} erano stati preceduti da LPM con alti valori di p16^{INK4A} così come CSO con p16^{INK4A} negativa erano stati preceduti da LPM sempre p16^{INK4A} negativa [134].

In letteratura l'alterata espressione della proteina p16^{INK4A} è stata anche messa in relazione alla presenza di displasia [94, 135-136], ma un successivo lavoro di Bradley et al. non ha confermato la presenza di tale correlazione [137].

Una sovraespressione di p16^{INK4A} è stata anche messa in relazione alla presenza del virus HPV. La presenza di HPV nel caso orale anteriore è dibattuta. Una recente meta-analisi che, ha riportato valori di Odds Ratio di 3.98 per CSO, 4.03 per leucoplachia e 5.21 per Lichen Planus [36]. Dall'altra parte sono stati pubblicati lavori che invece hanno descritto come rara l'associazione tra CSO e HPV [37-39].

La relazione tra sovraespressione di p16^{INK4A} e presenza di HPV non è chiara. Hafkamp et al. in un lavoro del 2003 hanno ritrovato che 10 CSO con alti valori di p16^{INK4A} presentavano presenza di HPV e parimenti 10 CSO negativi per p16^{INK4A} risultavano anche negativi per la presenza di HPV [138]. Natarjan et al. invece hanno invece riportato alcuni casi p16^{INK4A} positiva in epiteli in cui non era stata riscontrata presenza di HPV [139].

Un recente lavoro del nostro gruppo di ricerca [140], confermato nei numeri da un secondo lavoro quasi contemporaneo [141], ha riportato elevati valori di p16^{INK4A} in più del 60% di pazienti affetti da LPO. Alcuni autori hanno riportato elevata presenza di HPV in pazienti affetti da LPO [142-148].

Scopo del presente lavoro è andare a studiare in una popolazione di pazienti affetti da LPO l'espressione della proteina p16^{INK4A} in relazione alla presenza di HPV.

Materiali e metodo

Lo studio è stato condotto su 47 campioni consecutivi ottenuti da pazienti affetti da LPO che si sono presentati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, sezione di Patologia Orale dell'Università degli Studi di Bologna, nel periodo che va dal Gennaio 2011 al Dicembre 2011.

I tessuti sono stati fissati in formalina 4% e inclusi in paraffina. Da questi si sono ottenute sezioni seriali di 2 μ , fissate con ematossilina-eosina per la valutazione istologica. La diagnosi istologica è stata fatta presso la sezione di Anatomia Patologica, Ospedale Bellaria, struttura afferente allo stesso Dipartimento. La real-time PCR per andare a valutare la presenza di HPV-DNA è stata eseguita presso il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna.

La diagnosi di LPO si basa sulle caratteristiche descritte precedentemente: quadro clinico bilaterale e simmetrica con presenza delle strie di Wickham. Quadro istologico caratterizzato da infiltrato flogistico cronico nel chorion, composto prevalentemente da linfociti maturi, che aggrediscono lo strato basale dell'epitelio (interruzione della membrana basale), in cui si rilevano aspetti di degenerazione dei cheratinociti (corpi apoptotici, di Civatte o cellule con citoplasma vacuolizzato), senza displasia [56, 59, 125].

Sono stati esclusi casi che presentavano GvHD o patologie autoimmuni sistemiche, terapie croniche o pregresse terapie locali o sistemiche con cortisone o altri immunosoppressori. Sono stati anche esclusi pazienti con possibile sovrainfezione da Candida.

Espressione immunoistochimica p16^{INK4A}

L'analisi immunoistochimica è stata realizzata mediante sistema VentanaAutomaticStainer; (VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.). L'anticorpo monoclonale anti-p16^{INK4a} (clone 16PO4, diluito 1:400) utilizzato, è stato prodotto dal laboratorio MTM (Heidelberg, Germania). Un gruppo di controllo positivo, consistente in sezioni di mucosa displastica della cervice uterina, è stato aggiunto a tutti i gruppi di vetrini. Le cellule sono state considerate positive per la p16^{INK4a} quando esibivano colorazione sia nucleare sia citoplasmatica.

In breve, è stata fatta un'analisi semiquantitativa contando la percentuale di cellule positive in 5 differenti campi da 0.12 mm² ad ingrandimento 40X. Casi che mostravano una positività superiore al 5% sono stati considerati positivi, come descritto anche da precedenti lavori [134, 137, 140, 149-150]. È stato anche valutato il sito di positività (cheratinociti

basali, sovrabasali e maturi). Nella FIGURA 12 è riportato un esempio di iperespressione di p16^{INK4A}.

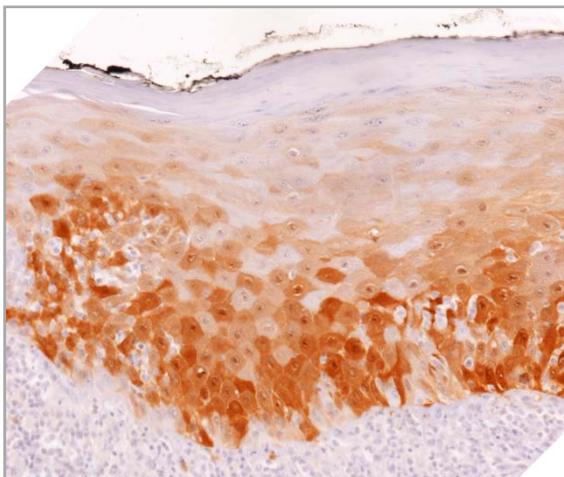


Figura 12

Estrazione del DNA

I campioni di DNA per la PCR sono stati ottenuti a partire dai campioni fissati in paraffina. 2 fette di 12 µm di spessore sono stati posizionate in xilolo per un'ora e centrifugate a 12000 giri. Il tessuto è stato trattato con etanolo per 2 volte e successivamente incubato per una notte a 56° C in una soluzione lisata con 1 mg/ml di proteinasi K. La proteinasi K è stata poi inattivata e i detriti cellulari rimossi per centrifugazione a 12000 giri per 5 minuti. Il DNA è stato infine purificato con Kit NucleoSpin (Macherey-Nagel), per ottenere così porzioni di DNA di 200 bp.

Identificazione di HPV-DNA

4 real-time PCR sono state ottenute per ogni campione. Il primo saggio quantitativo è stato fatto per valutare l'amplificabilità del campione andando ad individuare e quantificare il gene umano housekeeping HBMS. La seconda reazione è andata a individuare e quantificare i più comuni HPV ad alto rischio -16, -31, -18, -45. Le altre 2 reazioni hanno individuato la presenza di HPV mediante primerGp e Cp[151-152]. Queste 2 reazioni hanno avuto lo scopo di andare ad individuare la sola presenza di HPV, senza lo scopo di volerlo quantificare. Le reazioni per i primerGp e Cp sono state ottenute in 20 µl contenenti 10 µl di SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, Milano, Italia).

I primer e le sonde usate per l'identificazione di HVP -16, -18, -31 e -45 sono quelli precedentemente descritti da Moberg et al. [153]. Ogni reazione è stata fatta in un volume di 20 µl per 40 cicli. Le curve standard per HPV sono state costruite mediante una triplice reazione con un insieme dei plasmidi di HPV -16, -18 e -31 in diluizioni che variavano da 10¹ a 10⁷ copie come descritto in un precedente lavoro [40]. Curve standard per il gene umano HBMS sono state create usando diluizioni seriali con dosi che variano da 10¹ a 10⁵ del DNA estratto da sangue usando GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). L'assoluta quantificazione delle copie genomiche di ogni campione è stata ottenuta calcolando la carica virale in rapporto al numero di cellule. I campioni sono stati classificati come positivi per HPV quando la carica virale è stata > 0.1 (> 1 HPV-DNA/10 cellule) come precedentemente descritto [154]. Questo valore è basato sull'assunto che cariche virali più basse sono insufficienti per avere un ruolo nelle fasi precoci di cancerogenesi.

Identificazione del genotipo di HPV mediante analisi con Next Generation Sequencing (NGS)

Per identificare il più ampio spettro di genotipi appartenenti ad HPV, è stata analizzata una porzione della regione L1 generando ampliconi mediante un gruppo di primer elencati nella TABELLA 12.

Primer Name	Ann. Temp	Primer Forward	Primer Reverse
MY09/MY11	55°C	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA- TCAG-ACGCTCTCTC- CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGC-TCAG- ACTCACTAG- CCMCAGGGWCATAAAYAATGG-3'
GP5+/GP6+	50°C	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA- TCAG-ACGAGTGGT- TTTGTTACTGTGGTKGATACAC	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGC-TCAG- ACGCTCGACA- GAAAAACAAACTGYAAATCATAATC
CPI/CPIIG	55°C	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA- TCAG-ACGCTCGACA- TTATCWTATGCCCAATGTACCAT-3'	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGC-TCAG- ATATCGCGAG-ATGTTAATWSAGCCWCCAAAAATT- 3'
FAP59/FAP64	50°C	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA- TCAG-AGACGCACTC- TAACWGT/ideoxyI/GG/ideoxyI/CAYCCWT ATT -3'	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCCGC-TCAG- ATATCGCGAG- CCWATATCWVHCAT/ideoxyI/TC/ideoxyI/CCATC -3'

Tabella 12

L'identificazione dei genotipi di HPV è stata ottenuta mediante analisi con Next Generation Sequencing (NGS). Per avere ampliconi compatibili con le library della piattaforma 454 NGS, 100ng di DNA purificato è stato amplificato mediante PCR con i primer elencati in tabella. Le condizioni di PCR comprendono l'utilizzo di FastStartTaq High Fidelity DNA Polymerase (Roche AppliedSciences, Monza, Italia). I primer di fusione sono stati disegnati per contenere le sequenze adattatrici A e B, la sequenza chiave richiesta da 454 NGS e uno dei multiplex identifier (MID) barcodes, seguendo le istruzioni del produttore secondo il metodo di sequenziamento GS FLX. La PCR è stata eseguita con 1 ciclo a 95° C per 4 minuti, seguito da 40 cicli a 95° C per 30 secondi, l'allineamento dei primer specifici per 45 secondi, a 72° C per 1 minuto e un passaggio finale di 5 minuti a 72° C.

I prodotti ottenuti dalla PCR sono stati prima purificati usando AMPpurebeads (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA), poi quantificati, diluiti in 109 molecole/ μ L e raggruppati in accordo con i codici di compatibilità MID. Ogni library è stata amplificata con una PCR in emulsione usando il kit GS-FLX emPCR Kit library A ed è stato sequenziato in entrambe le direzioni usando 454 GS Junior Instrument (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA).

Sequenze specifiche per ogni campione sono state identificate sulla base dei loro codici MID associati e le sequenze fiancheggianti i primer sono state eliminate mediante Sff Workbench 1.3.0 (HeracleBiosoft). Le sequenze ottenute per tutti i campioni sono state confrontate con il PaVE (Human Papillomavirus Episteme) database mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e differenziate a seconda del sottotipo di HPV.

L'identificazione dei genotipi di HPV è stata ottenuta mediante analisi con Next Generation Sequencing (NGS). Per avere ampliconi compatibili con le library del 454 NGS, 100ng di DNA purificato è stato amplificato mediante PCR con i primer elencati in tabella e FastStartTaq High Fidelity DNA Polymerase (Roche AppliedSciences, Monza, Italia).

Analisi statistica

ANOVA a una via è stata utilizzata per valutare una possibile relazione tra i 2 gruppi (HPV positive e HPV negative) e i valori di p16^{INK4A}.

Il test del Chi quadrato è stato utilizzato per valutare ogni possibile associazione tra l'identificazione di HPV e una sovraespressione di p16^{INK4A} (positivo con valori >5%).

Risultati

Non è stato possibile identificare HPV-DNA in 12 casi; così che la popolazione di studio è risultata essere composta da 35 pazienti (11 uomini e 24 donne con range di età tra 28 e 81 anni, media 56.6 ± 12.2). Clinicamente 20 LPO presentavano lesioni reticolari mentre 15 LPO presentavano un quadro atrofico-erosivo. Una sovraespressione di p16^{INK4A} (valori >5%) è stata trovata in 26/35 campioni (74%). 15/26 campioni positivi per p16^{INK4A} presentano un quadro clinico caratterizzato da lesioni reticolari mentre i restanti 11 presentano un quadro clinico atrofico/erosivo.

DNA appartenente ad HPV ad alto rischio è stato identificato in un solo campione, positivo per HPV 16. Sono poi stati identificati altri 3 campioni positivi per HPV a basso rischio, il primo ad HPV di tipo 4, il secondo ad HPV di tipo 6 e il terzo campione invece presentava una co-infezione per HPV4 e 24.

I valori di p16^{INK4A} in relazione alla positività per HPV sono stati riportati nel GRAFICO 2.

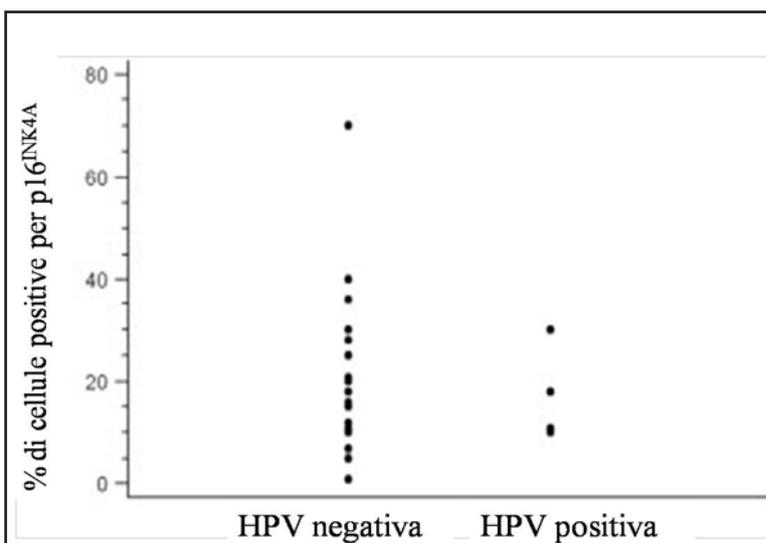


Grafico 2

ANOVA a una via mostra una assenza di relazione tra i valori di p16^{INK4A} e la positività per HPV ($F=.07$; ns).

Considerando il cut-off di p16^{INK4A} (positivo per valori >5%), tutti e 4 i campioni positivi per HPV risultavano avere una sovraespressione di p16^{INK4A}. Al tempo stesso sono però stati individuati 22 campioni positivi per p16^{INK4A} ma negativi per la presenza di HPV. Il test del Chi quadrato mostra una assenza di relazione statistica tra sovra espressione di p16^{INK4A} e presenza di HPV (Chi quadrato= .55; ns).

Discussione

La sovraespressione di p16^{INK4A} mediante immunohistochimica in LPO è un argomento poco descritto in letteratura. La proteina p16^{INK4A} è un buon indicatore della presenza di HPV, come riportati in lavori che hanno analizzato lesioni displastiche e neoplastiche della cervice uterina [27-28]. Una sovraespressione di p16^{INK4A} sembra accompagnare la presenza di HPV anche in CSO e in LPM [136, 138, 155-156], sebbene il ruolo di HPV nel cavo orale è molto più controverso rispetto alla cervice uterina. Un'elevata incidenza di HPV, con valori che vanno dal 15 al 30% [142-143, 145-146] secondo alcuni autori e dal 30 al 70% [144, 147-148] secondo altri sono stati identificati in LPO. Nessun lavoro prima d'ora è andato però a valutare la presenza di HPV in relazione all'espressione di p16^{INK4A} in pazienti affetti da LPO.

I risultati del presente studio confermano come una sovraespressione di p16^{INK4A} sia un evento frequente in LPO, in accordo con i 2 precedenti lavori [140-141]. Questo dato rafforza maggiormente il concetto per cui p16^{INK4A} in LPO non può essere considerato un marker prognostico di trasformazione maligna. Infatti il lichen è stato incluso dall'OMS tra le LPM [88], anche se alcuni autori considerano tale patologia come benigna [149, 157-158]. Indipendentemente che si tratti o meno di una LPM i pochi studi longitudinali presenti indicano che il lichen ha un indice di trasformazione maligna che è intorno all'1% [67-69].

I risultati emersi dal presente lavoro inoltre sembrano indicare come tale sovraespressione di p16^{INK4A} non per forza è indice di presenza di HPV. Infatti una p16^{INK4A} positiva è stata identificata nel 74% della popolazione analizzata, contro il solo 10% di pazienti HPV positivi.

Nel precedente lavoro pubblicato dal nostro gruppo di ricerca avevamo individuato una positività di p16^{INK4A} anche in un gruppo di lesioni infiammatorie del cavo orale non specificate. Si era così ipotizzato che la presenza di una p16^{INK4A} positiva potesse essere influenzata dalla presenza di tessuto infiammatorio.

La possibilità che elevati valori di p16^{INK4A} in LPO sia in relazione al tessuto infiammatorio può trovare spiegazione da dati recenti che mostrano come il ruolo di alcune citochine coinvolte nel processo di genesi e mantenimento del processo infiammatorio vadano ad interferire con il pathway di p16^{INK4A} [159-160]. Ad esempio, il Tumor Necrosis Factor (TNF- α) è una citochina pro-infiammatoria con un importante ruolo in numerose patologie autoimmuni tra le quali LPO [159, 161]. TNF- α è stato recentemente messo in relazione con p16^{INK4A} in lavori che hanno mostrato come un prolungato stato di infiammazione può portare ad un aumento di espressione di p16^{INK4A} mediante il meccanismo legato a p38 MAPK [162]. Una seconda citochina altamente presente in LPO è l'interferon- γ . Anch'esso ha un importante ruolo nei

processi di iniziazione e mantenimento del processo infiammatorio ed è stato riportato in alcuni lavori che può portare ad un arresto della replicazione cellulare dei cheratinosi mediante una up-regolazione di p16^{INK4A} [163-164].

Rimane da valutare se elevati valori di p16^{INK4A} possano in qualche modo essere messi in relazione con il dato di ipermetilazione di miR137 riscontrato in LPO nel precedente lavoro. miR137 sembra giocare un ruolo chiave nella differenziazione cellulare e nel controllo del ciclo cellulare, in parte attraverso il controllo dell'espressione di Cdk6 [133, 165]. Un'affascinante ipotesi è che l'ipermetilazione di miR137 comporta una bassa espressione di miR137, quindi con la perdita del meccanismo inibitorio per Cdk6. L'elevata presenza di Cdk6 potrebbe così giustificare come compenso la sovraespressione di p16^{INK4A}.

Conclusioni

In conclusione il presente lavoro mostra come una sovraespressione di p16^{INK4A} in pazienti affetti da LPO non sembra essere in relazione con la presenza di HPV e che p16^{INK4A} in LPO non può essere considerato un marker indicativo di rischio di trasformazione maligna.

PARTE 2: SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI

CLASSIFICAZIONE E CLONALITÀ

I pazienti affetti da CSO tendono a sviluppare nuovi tumori nella stessa sede o anche a distanza dalla sede primitiva. L'incidenza delle seconde manifestazioni tumorali è tra il 10 e il 34% [42]. Alcuni lavori hanno riportato che più del 20% dei pazienti entro 5 anni presenta la comparsa di un secondo carcinoma primario [166-168] ma la maggior parte delle seconde manifestazioni viene diagnosticata ad un anno dal primo tumore. Lo sviluppo di una seconda manifestazione tumorale ha un forte impatto sulla sopravvivenza a lungo termine e compromette la prognosi soprattutto nei pazienti diagnosticati precocemente e in cui il tumore è stato trattato nelle fasi iniziali [166].

Un tempo si pensava che la frequente comparsa di nuovi tumori a distanza di tempo fosse legata all'imperizia del chirurgo in occasione dell'asportazione del primo tumore, oggi invece sono state sviluppate nuove teorie che hanno fatto luce sulla patogenesi e sullo sviluppo di nuovi carcinomi del paziente operato:

- *Premalignant cell migration*: il secondo carcinoma si può sviluppare dalla diffusione di alcune cellule provenienti dal tumore primario. La migrazione può avvenire per mezzo di micrometastasi attraverso saliva, vasi linfatici o materiale ematico; o a livello intraepiteliale a partire dalle progenie di cellule alterate. In entrambe le ipotesi le alterazioni geniche del secondo tumore saranno perfettamente sovrapponibili a quelle del primo tumore.
- *Field Cancerization*: stabilisce che il secondo tumore origini dallo stesso campo di mucosa alterata in cui si è sviluppato il primo carcinoma. Questa teoria, venne proposta da Slaughter [169] già nel 1953 mentre studiava la presenza di tessuto istologicamente anormale attorno al carcinoma squamoso orale e, presuppone che, in un epitelio normale al momento "zero", una singola cellula staminale localizzata nello strato basale dell'epitelio acquisisca una o più alterazioni geniche ed inizi a proliferare più velocemente rispetto alle altre determinando la formazione di un "patch", cioè un'unità clonale di cellule figlie alterate che possiede la stessa modificazione del DNA. Come risultato delle alterazioni geniche, la cellula staminale esce dal normale controllo, guadagna sempre più vantaggio di crescita ed il "patch" inizia ad espandersi in direzione laterale, trasformandosi in un campo (field) di alterazioni più esteso. Tutto ciò avviene anche grazie all'accumulo di ulteriori alterazioni geniche che portano il "field" a

proliferare sempre più rapidamente prendendo gradualmente il posto della mucosa normale. All'interno di questo campo, due o più processi indipendenti, in seguito al sommarsi di ulteriori alterazioni geniche, possono portare ad esempio alla formazione di due diversi carcinomi. In questo caso le alterazioni geniche del secondo tumore non saranno esattamente uguali a quelle del primo tumore. Il fatto che questo campo di mucosa geneticamente alterata rimanga spesso dopo aver asportato chirurgicamente il tumore primario può spiegare l'alta frequenza di recidive locali e lo sviluppo di nuove lesioni neoplastiche.

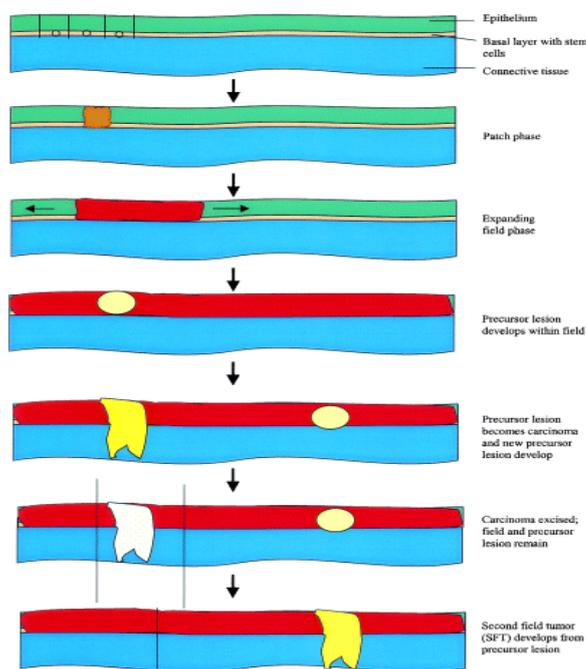


Figura 13: Braakhuis et al. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications
Journal of Oral Pathology & Medicine Volume 33, Issue 6, pages 317-322, 16 JUN 2004 DOI: 10.1111/j.1600-0714.2004.00225.x <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0714.2004.00225.x/full#f1>

Una seconda manifestazione quindi, considerando i meccanismi patogenetici che possono portare alla sua origine, può appartenere al tumore primitivo e in questo caso viene definita come Recidiva Locale (RL) o altrimenti può essere un secondo evento indipendente ed in questo caso viene definita come Secondo Tumore Primitivo (STP). Diagnosticare una RL piuttosto che una STP non ha un ruolo semplicemente didattico, ma può influenzare la diagnosi, la prognosi e il tipo di trattamento.

Warren e Gates [170] già nel 1932 avevano cercato di stabilire dei criteri clinici per definire i secondi tumori primitivi:

- ognuno dei tumori deve avere un definito quadro di malignità;

- ognuno deve essere distinto;
- la possibilità che il secondo sia una metastasi del primo tumore deve essere esclusa.

La prima caratteristica può essere facilmente individuata tramite esami istopatologici, mentre le due successive hanno creato negli anni problemi di classificazione.

Hong nel 1990 [171] propone tre criteri per distinguere un secondo tumore primario da una recidiva locale: il tipo istologico dei due tumori, la distanza e il tempo che intercorrono tra un tumore e l'altro. Una RL viene definita tale nel caso in cui presenta le stesse caratteristiche istologiche rispetto al tumore primitivo, compare entro i 2 cm e entro i 3 anni rispetto al tumore primitivo.

Viceversa viene definito STP una lesione con istologia differente rispetto al tumore primitivo o con lesioni con stessa istologia se compaiono dopo 3 anni dal tumore primitivo o ad una distanza maggiore di 2 cm. La classificazione di Hong è quella attualmente maggiormente utilizzata per differenziare RL e STP.

In letteratura però non c'è accordo nel quantificare in particolar modo la distanza. Hong parla di 2 cm [171], Scholes nel 1998 di 1,5 cm [172] e Tabor nel 2002 di 3 cm [173]; in aggiunta c'è disaccordo su se e come eseguire la misurazione di tale distanza quando sono anche presenti lesioni preneoplastiche o solo in caso di mucosa clinicamente sana. Leong in un articolo del 1998 preferisce utilizzare come unico parametro di distinzione il tempo [174]. Braakhuis nel 2002 [166], in base alle caratteristiche molecolari e prendendo in considerazione entrambe le teorie sulla patogenesi dei secondi tumori (cancerizzazione a campo e migrazione delle cellule preneoplastiche), propone una nuova classificazione dei secondi tumori manifestatisi in una sede differente dal primo, dividendoli in due gruppi a seconda della sede:

- a) adiacente o nella stessa sede anatomica (cavo orale o orofaringe):
 1. pattern molecolare simile → recidiva locale o Premalignantcellmigration;
 2. pattern molecolare in parte differente → Second Field Tumor (SFT);
 3. pattern molecolare differente → "true STP": si origina da un evento casuale e indipendente;
- b) differente sede anatomica (laringe, esofago, polmone):
 1. pattern molecolare simile → metastasi o Premalignantcellmigration;
 2. pattern molecolare in parte differente → Second Field Tumor (SFT);
 3. pattern molecolare differente → "true STP".

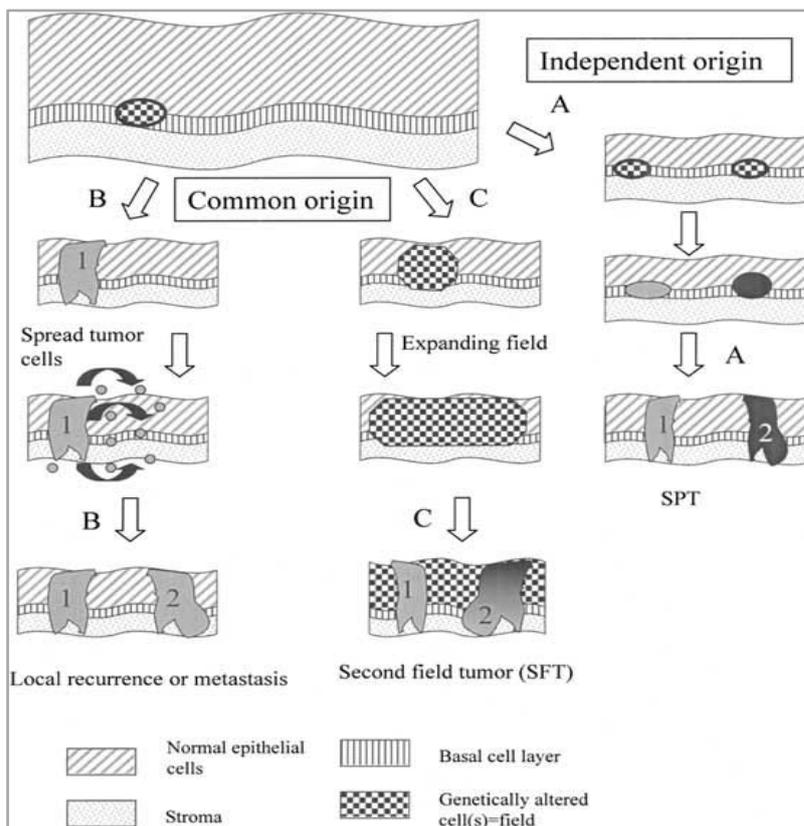


Figura 14: Braakhuis et al. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. *Head & Neck* Volume 24, Issue 2, pages 198-206, 4 JAN 2002 DOI: 10.1002/hed.10042 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.10042/full#fig1>

Rispetto alla classificazione clinica Braakhuis et al. distinguono il Secondo Tumore Primitivo in: STP vero, inteso come evento casuale e SFT o “Secondo Tumore di Campo”, ovvero una seconda manifestazione indipendente ma originata all’interno di un “campo” di cellule alterate. Sarode, in un recente editor su *OralOncology* [175], sostiene che i futuri lavori che vanno a studiare la natura e il comportamento delle manifestazioni tumorali multiple dovrebbero distinguere LR, SPT e SFT, seguendo la classificazione di Braakhuis e adottando una metodica molecolare per lo studio delle seconde manifestazioni. Studi di clonalità nel passato si sono avvalsi dell’utilizzo di metodiche di biologia molecolare quali: l’analisi del cariotipo e la citogenetica, lo studio del cromosoma X, l’analisi delle mutazioni di TP53, la perdita di eterozigosi (loss of heterozygosity LOH), metodiche di microarray [176-180] e più recentemente il sequenziamento dell’intero genoma mediante metodica di NGS [181-182]. Nessuna di queste tecniche, tuttavia, è priva di limiti e nessuna è ufficialmente validata ed utilizzata nella pratica clinica [176].

Un problema comune nell’individuare una metodica affidabile per lo studio della clonalità è l’individuazione di quelle alterazioni genetiche che sono precoci e uniche nella lesione e non

vengono individuate invece nel tessuto sano. Inoltre le mutazioni spesso tendono ad accumularsi e a cambiare durante la progressione in tumore. Una mutazione genetica per essere definita come un potenziale marker di clonalità dovrebbe presentare le seguenti condizioni:

- Comparire prima della comparsa della metastasi
- La mutazione dovrebbe mantenersi durante la progressione neoplastica e metastatica
- Le mutazioni della lesione non dovrebbero essere presenti nel tessuto sano [176].

LAVORO 3: PARAMETRI CLINICI E ISTOLOGICI PREDITTIVI DI SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI

Introduzione

Individuare dei marker predittivi di seconde manifestazioni tumorali può aiutare l'identificazione del paziente a reale rischio di secondo tumore ed eventualmente indirizzare la terapia della neoplasia primitiva verso un approccio più o meno "aggressivo". La valutazione istologica dei campioni tumorali rimossi dal chirurgo può dare importanti informazioni dal punto di vista prognostico. Caratteristiche quali l'infiltrazione perineurale, l'invasione vascolare, il grading di differenziamento e la distanza di resezione dei margini chirurgici sono variabili che diversi autori hanno relazionato alla comparsa di metastasi linfonodali (ML) e/o recidive [183-186].

Gran parte della letteratura però non fa una chiara distinzione tra RL e STP e ML, riportando spesso una dicitura generica come evento avverso. In realtà si tratta di entità diverse che possono portare ad una diversa prognosi per il paziente ed eventualmente richiedono un diverso trattamento [187-188].

Lo scopo del presente lavoro è andare a valutare la possibile associazione tra caratteristiche cliniche e istologiche del tumore primitivo e la comparsa di RL, ML o STP in una popolazione di pazienti trattati presso l'Ospedale Bellaria per CSO dal 1997 al 2007.

Materiali e metodo

La popolazione di studio consiste di 180 casi ottenuti andando a consultare il database Pathwin dell'Unità di Anatomia Patologica dell'Ospedale Bellaria, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna. La popolazione di studio comprende 180 pazienti di origine caucasica tutti trattati per CSO in un periodo di tempo che va dal 1997 al 2007. I casi sono stati selezionati a partire da un totale di 254 pazienti trattati nel periodo preso in esame per lo studio. I criteri di selezioni sono stati i seguenti: il paziente non doveva avere effettuato una precedente radio- o chemioterapia, il tumore doveva essere stato radicalmente rimosso e doveva esserci un follow up minimo di 12 mesi.

Le diagnosi istologiche sono state effettuate in accordo con le recenti linee-guida [189]. I preparati di ematossilina-eosina di tutti i casi sono stati riconsiderati da 2 anatomo-patologici con esperienza in patologia orale (FF, MPF), non a conoscenza del follow up clinico

del paziente. Le cartelle cliniche sono state tutti rivalutate al fine di completare le informazioni relative alla storia clinica e al follow-up del paziente.

Radioterapia post-intervento adiuvante con dosi da 50 a 66 Gy sono state effettuate in pazienti con un margine di resezione positivo, linfonodi positivi multipli o grosse dimensioni della massa tumorale.

– Le variabili cliniche analizzate includono lo stadio del tumore, classificato in accordo con la classificazione TNM della “Union of International Cancer Control [190].

– Il T viene definito e distinto in:

TX= il tumore primitivo non può essere misurato

T0= il tumore primitivo non è presente

Tis= carcinoma in situ

T1= l’asse maggiore del tumore è di 2cm al massimo, od inferiore

T2= l’asse maggiore del tumore supera i 2cm fino a raggiungere un massimo di 4cm.

T3= l’asse maggiore del tumore supera i 4cm.

T4 (labbro)= il tumore raggiunge ed infiltra l’osso corticale, il nervo alveolare inferiore, il pavimento della bocca, la pelle del viso.

T4 (cavo orale)= il tumore invade le strutture adiacenti: osso corticale, muscolatura estrinseca della lingua (muscoli genioglosso, ipoglosso, palatoglosso e stiloglosso), seni mascellari o pelle del volto.

T4b = il tumore invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base del cranio o circonda l’arteria carotide interna.

– Il valore N viene classificato e distinto in:

NX= i linfonodi loco-regionali non possono essere valutati.

N0= non sono presenti metastasi linfonodali.

N1= presente metastasi linfonodale in un linfonodo omolaterale alla neoplasia, di dimensioni di 3cm o minori di asse maggiore.

N2

N2a= metastasi in un singolo linfonodo omolaterale di dimensioni maggiori a 3cm, ma non superiori a 6cm di asse maggiore.

N2b= metastasi in più linfonodi omolaterali, con dimensioni non superiori ai 6cm di asse maggiore per ciascun linfonodo.

N2c= metastasi in linfonodi controlaterali o bilaterali, con dimensioni non superiori ai 6cm di asse maggiore per ciascun linfonodo.

N3= metastasi in un linfonodo con dimensioni superiori a 6cm di asse maggiore.

- Infine il valore M viene definito e distinto in:

Mx= la presenza di metastasi a distanza non può essere valutata.

M0= non è presente alcuna metastasi a distanza.

M1= sono presenti una o più metastasi a distanza.

Il valore di M è raramente utilizzato negli studi relativi al CSO, esso è infatti di raro riscontro anche nella pratica clinica.

La Tomografia computerizzata (TC) e l'esame clinico prima dell'intervento chirurgico hanno permesso di identificare tutti i pazienti con metastasi linfonodali positive, secondo i criteri di van de Brekel et al. [178].

Le caratteristiche istologiche hanno incluso:

- Il grading istologico: definito secondo in accordo con i criteri di Kademani et al. [12].
 - G1= carcinoma squamoso BEN differenziato
 - G2= carcinoma squamoso MODERATAMENTE differenziato
 - G3= carcinoma squamoso SCARSAMENTE differenziato
- Lo stato dei margini chirurgici: calcolato a partire dal punto più vicino di resezione dal margine chirurgico ed è classificato in 4 categorie in accordo con le linee guida della "Royal College of Pathologists" [179]:
 - Distanti: nessuna evidenza di carcinoma o presenza di precursori epiteliali entro 5 mm dal margine (FIGURA 15)

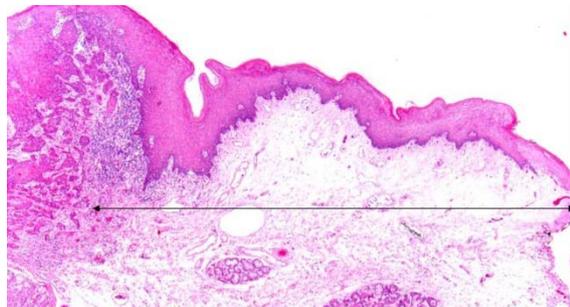


Figura 15

- Vicini: evidenza istologica di carcinoma tra 5 mm e 1 mm dal margine, ma non al margine (FIGURA 16).

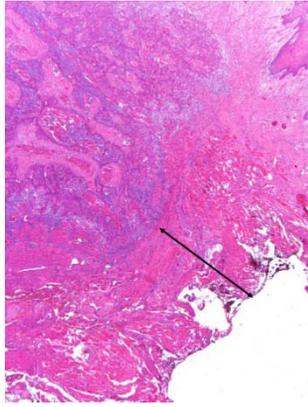


Figura 16

- Displasia moderata-servera o carcinoma in situ entro i 5 mm dal margine, ma assenza di carcinoma invasivo (FIGURA 17).

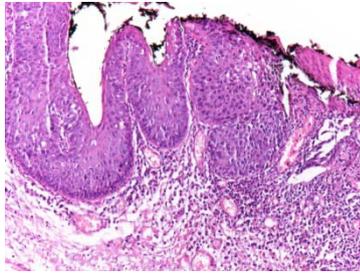


Figura 17

- Margine coinvolto: evidenza di carcinoma entro 1 mm dal margine (FIGURA 18).

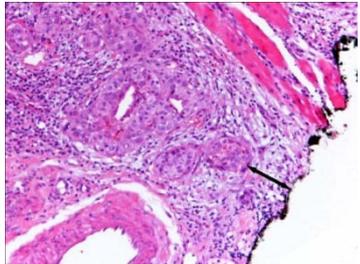


Figura 18

- Profondità di invasione: definita in accordo con Ambrosch et al. 1995 [181] come la massima profondità di infiltrazione del tumore (misurata in mm) al di sotto della superficie mucosa. Il cut-off è stato definito in 4 mm [170].
- Infiltrazione perineurale (IPN): definita come invasione tumorale dello spazio della guaina perineurale (FIGURA 19).

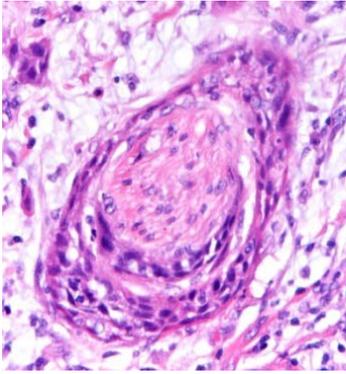


Figura 19

- Invasione vascolare: definita come la presenza di emboli tumorali all'interno delle strutture vascolari.
- Tumore multicentrico: presenza di foci tumorali multipli separati da tessuto non tumorale.

Gli endpoint sono stati considerate nel presente lavoro la comparsa di Metastasi Linfonodale (ML), Recidiva Locale (RL) e Secondo Tumore Primitivo (STP). RL e STP sono stati distinti seguendo i criteri di Hong et al. [171].

Analisi statistica

Età del paziente, sesso, grading istologico, stato dei margini chirurgici, profondità di invasione, invasione perineurale, invasione vascolare, Radioterapia adiuvante sono tutte variabili analizzate per la loro relazione con la comparsa di seconde manifestazioni (RL e STP) e ML durante follow-up. La sopravvivenza è stata calcolata usando metodo secondo Kaplan-Meier. La significatività statistica è stata valutata usando il log-rank test. Il tempo è stato definito come il periodo intercorso tra il trattamento e l'evento target (RL, STP e ML) o l'ultimo follow-up. P valute $<.05$ sono stati considerati statisticamente significativi in tutte le analisi effettuate.

Risultati

Considerando i 180 pazienti, 86 erano di sesso maschile e 94 di sesso femminile con un età media di 62.8 ± 13.8 . Novantasette tumori si sono sviluppati sulla lingua, 12 sul pavimento del cavo orale, 20 sulla gengiva superiore, 30 a livello della gengiva inferiore e 13 sulla mucosa geniena. 96 pazienti sono stati trattati solo con terapia chirurgica mentre 84 hanno ricevuto anche radioterapia adiuvante. Svuotamento linfonodale è stato eseguito in 168

pazienti (12 di essi con un CSO micro infiltrante): 112 non presentavano interessamento linfonodale al momento della diagnosi mentre 56 presentavano almeno un linfonodo positivo. Tutti i pazienti che non hanno avuto eventi avversi hanno presentato un follow up minimo di 12 mesi (follow up medio di 64.4 ± 40.7 con un range da 12 a 167 mesi). La TABELLA 13 riassume tutte le caratteristiche della popolazione di studio.

		N°	Metastasi Linfonodali		Recidive Locali		Secondi Tumori Primitivi	
			Casi %	p	Casi %	p	Casi %	p
Età	<62	87	9%	0.253	7%	0.877	21%	0.749
	>62	93	13%		8%		19%	
Sesso	Maschi	86	11%	0.982	5%	0.206	18%	0.955
	Femmine	94	11%		10%		21%	
Stadio T	T1	74	9%	0.191	8%	0.971	27%	0.137
	T2	52	10%		6%		10%	
	T3	12	0%		8%		8%	
	T4	42	16%		7%		21%	
Stadio N	N negativo	112	9%	0.063	7%	0.980	21%	0.758
	N positivo	56	16%		7%		14%	
Grading istologico	Ben diff	50	4%	0.130	8%	0.888	24%	0.597
	Mod. Diff	81	11%		6%		20%	
	Scars. Diff	49	16%		8%		14%	
Marginechirurgico	Distanti	55	10%	0.635	2%	0.204	10%	0.003
	Vicini	62	14%		11%		18%	
	Displasia sul	21	10%		5%		43%	
	Coinvolti	42	5%		10%		24%	
Profondità d'invasione	<4 mm	48	6%	0.070	5%	0.360	26%	0.388
	>4 mm	132	13%		9%		14%	
Infiltrazione perineurale	No	141	8%	0.030	5%	0.017	22%	0.232
	Si	39	18%		15%		7%	
Radioterapia adiuvante	No	96	8%	0.053	5%	0.223	19%	0.190
	Si	84	14%		10%		21%	
Invasione vascolare	No	167	11%	0.792	8%	0.309	20%	0.953
	Si	13	8%		1%		16%	
Multicentrico	No	162	11%	0.525	8%	0.238	19%	0.266
	Si	18	6%		1%		27%	

Tabella 13

Metastasi Linfonodali (ML) durante il follow up sono comparse in 19 (10%) pazienti (da dopo 2 mesi dall'intervento sino a dopo 123 mesi; media 21.0 ± 29.99). I risultati dell'analisi statistica secondo il metodo di Kaplan-meier ha mostrato come l'infiltrazione perineurale (IPN) risulti l'unica variabile statisticamente correlata con la comparsa di metastasi linfonodale (chi quadrato 4.7; $p=0.030$): 7/39 (18%) che presentavano IPN hanno avuto ML rispetto a 12/141 (8%) che invece non presentavano IPN. GRAFICO 3

Grafico 3

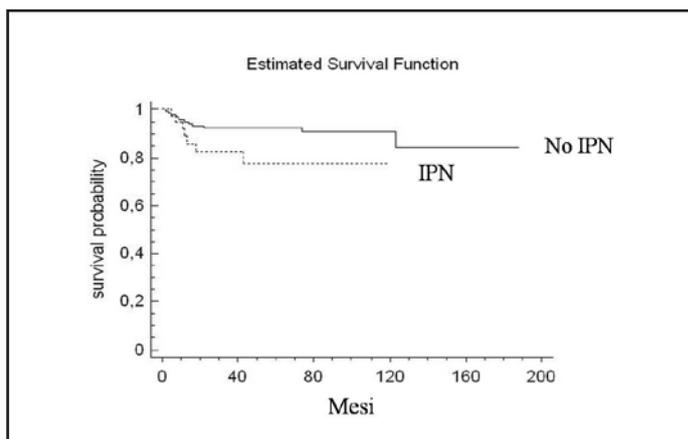


Grafico 3

Per eliminare il possibile effetto confondente della radioterapia, è stata fatta analisi statistica nel solo gruppo di 96 pazienti trattati unicamente con chirurgia. Anche in questo caso rimane una relazione statisticamente significativa tra IPN e LM (chi quadrato 3.4; $p=0.044$): 2/11 (18%) casi con IPN positiva hanno sviluppato ML rispetto a 5/85 (6%) casi con IPN negativa. Analizzando il solo gruppo di tumori piccoli (T1-T2), 3/14 (21%) con IPN hanno sviluppato ML rispetto a 9/112 (8%) che non avevano IPN; ma questa differenza non raggiunge la significatività statistica.

Recidiva Locale (RL): durante il follow up 13 (7%) pazienti hanno sviluppato RL (range follow up 3-23 mesi; media 11.4 ± 6.2 mesi). L'IPN anche in questo caso si è dimostrato l'unica variabile significativamente correlata con la comparsa di RL (chi quadrato 5.7; $p=0.017$): 6/39 (15%) casi che presentavano IPN hanno sviluppato RL rispetto a 7/141 (5%) che invece non presentavano infiltrazione. **GRAFICO 4**

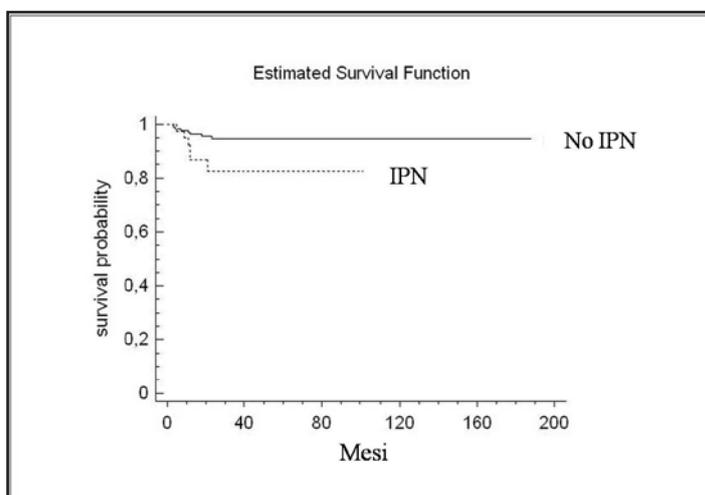


Grafico 4

L'analisi univariata ha confermato per RL la significatività statistica anche nel gruppo trattato con chirurgia (chi square 5.3; $p=0.021$): 2/11 (18%) casi che presentavano IPN hanno sviluppato RL rispetto a 3/85 (3%) che invece non la presentavano. La significatività statistica è stata individuata anche andando ad analizzare il solo gruppo di tumori piccoli (T1-T2) (chi square 5.2; $p=0.022$): 3/14 (21%) casi che presentavano IPN hanno sviluppato RL rispetto a 6/112 (5%) che invece non la presentavano.

Secondo Tumore Primitivo (STP): durante il follow up sono stati individuati 35 pazienti (range follow up 11-162 mesi; media 61.1 ± 36.9 mesi). Lo stato del margine chirurgico è stata individuata come l'unica variabile significativamente correlata con la comparsa di STP (chi quadrato 13.6; $p=0.003$): hanno sviluppato STP 5 (10%) casi con margini distanti, 11 (18%) con margini vicini, 9 (43%) casi con displasia sul margine e 10 (24%) casi con margine coinvolto. GRAFICO 5

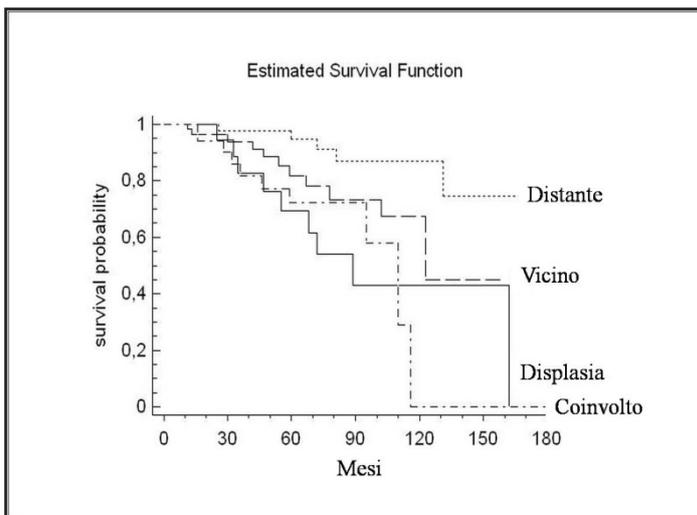


Grafico 5

In particolare campioni con displasia sul margine differiscono in maniera statisticamente significativa rispetto a campioni con margini distanti o vicini (chi square 10.5; $p=0.005$) mentre non c'è differenza statisticamente significativa con campioni con margini coinvolti (chi square .01; $p=0.900$).

Per valutare gli effetti anche in questo caso della radioterapia anche per gli STP sono stati analizzati solo i 96 pazienti trattati con chirurgia. La metodica Kaplan-Meier ha confermato la presenza di una differenza statisticamente significativa (chi quadrato 10.3; $p=0.016$). Anche nei pazienti con tumori T1-T2 lo stato del margine chirurgico risulta statisticamente correlato con la comparsa di STP: 4/45 casi avevano margini distanti, 7/44 casi avevano margini vicini.

9/16 avevano displasia sul margine e 5/21 avevano margini coinvolti (chi quadrato 13.4; $p=0.001$).

Discussione

I risultati hanno mostrato come l'infiltrazione perineurale e lo stato del margine chirurgico siano risultate le uniche variabili correlate con la prognosi nel CSO, sia prendendo in considerazione l'intera popolazione che anche solo analizzando i tumori T1-T2. L'infiltrazione perineurale è stata individuata nel 20% di pazienti affetti da CSO. Questa percentuale è comparabile a quella di altri lavori [176-178], Kurtz et al. sono gli unici che in un loro lavoro del 2005 hanno individuato una percentuale più elevata (82%) [179]. Numerosi lavori hanno anche individuato un impatto prognostico dell'infiltrazione perineurale, associando tale variabile con la comparsa di recidiva e la possibilità di avere metastasi loco-regionali o a distanza, o anche associando tale valore con la sopravvivenza a 5 anni [177-178, 181-184]. Nel presente lavoro inoltre è da notare come l'infiltrazione perineurale sia associata con la comparsa di eventi avversi precoci (entro i 3 anni).

Come descritto precedentemente esistono 2 ipotesi relative all'origine di seconde manifestazioni nel cavo orale: RL sembra essere associata alla presenza di cellule tumorali non rimosse durante l'intervento chirurgico, STP sono invece probabilmente in relazione al concetto di field cancerization [169, 191-193]. Numerosi lavori hanno identificato la presenza di displasia al margine chirurgico e hanno collegato questo con un peggioramento prognostico. Wejers et al. hanno messo in relazione la ricomparsa di malattia con la presenza di displasia sul margine chirurgico [190]. Anche Kurita et al. hanno trovato la stessa relazione tra displasia sul margine ed eventi avversi, senza tra l'altro trovare differenze statisticamente significative tra casi che presentavano displasia sul margine e casi con margine chirurgico coinvolto [191]. Loree e Strong e Upile et al. hanno entrambi trovato una differenza significativa in comparsa di eventi avversi tra margini chirurgici negativi e presenza di displasia sul margine [194-195].

Nel presente lavoro la displasia sul margine è risultata un' importante variabile predittiva di STP: 43% di pazienti con displasia sul margine ha sviluppato CSO. È interessante notare come la displasia sul margine risulti una variabile correlata con la comparsa di seconde manifestazioni tardive. Tutti i casi di STP, eccetto uno, si sono sviluppati in un tempo maggiore di 3 anni rispetto al tumore primitivo.

Considerata la letteratura, solo uno studio ha identificato la presenza di displasia sul margine distinguendo RL e STP [196], dimostrando una correlazione tra displasia sul margine e solo STP. I nostri dati sembrano essere in accordo con questo studio e sembrano sottolineare la validità del concetto di cancerizzazione di campo. Questo può anche avere un riscontro clinico, poiché la radioterapia in questi pazienti potrebbe essere controindicata, potendo, potenzialmente, accelerare la cancerogenesi [173]. In questi casi diventa un'opzione preferibile uno stretto follow-up.

Infine delle controversie sono presenti relativamente alla quantità di tessuto sano rimosso oltre il CSO. La precisa definizione di margine libero o margine chirurgico adeguato è importante per le implicazioni cliniche e terapeutiche. Non c'è consenso su quale debba essere la distanza corretta considerata come margine libero. Alcuni autori accettano meno di 2 mm [196-198], altri meno di 3 mm [199-200]. La maggior parte degli autori considerato come adeguato un margine di almeno 5 mm [194, 201-203].

I nostri risultati sono in accordo e considerano come valore i 5 mm. Da considerare che i dati non si modificano nel momento in cui viene presa in considerazione una distanza di 4 mm.

Conclusioni

RL e ML sembrano essere eventi precoci dopo la chirurgia nel paziente affetto da CSO e sono correlati con la presenza di infiltrazione perineurale. I pazienti con infiltrazione perineurale positiva potrebbero beneficiare di un intervento chirurgico più radicale o con interessamento anche dei linfonodi.

Dall'altra parte i STP sono eventi tardivi e sembrano essere correlati con il margine chirurgico, in particolar modo la presenza di displasia sul margine. Nei pazienti con presenza di displasia sul margine potrebbe risultare controindicata la radioterapia, bensì risulta necessario un più stretto follow-up.

Lavoro 4: ANALISI DELLA REGIONE D-loop del DNA MITOCONDRIALE NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE SECONDE MANIFESTAZIONI TUMORALI DEL CAVO ORALE.

Introduzione

Il precedente lavoro ha dimostrato, oltre alla presenza di parametri istologici correlati con la comparsa di seconde manifestazioni tumorali, anche un comportamento differente tra RL, STP e ML. Nel precedente lavoro la distinzione tra le diverse manifestazioni tumorali è stata fatta seguendo i criteri di Hong [171], classificazione maggiormente utilizzata nella pratica clinica quotidiana.

Delle volte però criteri come lo spazio e il tempo possono dare insufficienti o errate informazioni per capire se una seconda manifestazione tumorale appartiene o meno al tumore primitivo. Per superare i limiti relativi alla classificazione clinica molti autori hanno così proposto l'utilizzo di differenti metodiche biomolecolari per studiare la clonalità: lo studio del cromosoma X, l'analisi delle mutazioni di TP53, la perdita di eterozigosi (loss of heterozygosity LOH), metodiche di microarray [176-180] e più recentemente il sequenziamento dell'intero genoma mediante metodica di Next Generation Sequencing [181-182].

Fra le metodiche di clonalità proposte in letteratura, lo studio del cromosoma X e del genoma mediante metodica CGH-array non sono applicabili nella pratica clinica. L'analisi del cromosoma X è utilizzabile solo per campioni provenienti da donne mentre il CGH-array è una metodica costosa e che richiede molto tempo e richiede una gran quantità di DNA disponibile [179-180].

L'analisi delle mutazioni di TP53 è stata proposta anche come metodica per studiare la clonalità tra diverse manifestazioni tumorali. Infatti, circa il 50-90% dei tumori contiene mutazioni di questo gene e che queste mutazioni possono essere estremamente variabili [82, 204]. Alterazioni in questo gene inoltre avvengono precocemente in CSO e sono presenti in LPM [87].

Recentemente il gruppo di Bologna ha proposto l'analisi della regione D-loop del DNA mitocondriale come potenziale marker di clonalità.

E' stata infatti evidenziata un'alta frequenza di mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) in ambito tumorale, specialmente nella regione genomica D-loop.

Il mtDNA presenta delle peculiarità che lo rendono un potenziale marker di clonalità. E' presente in gran numero all'interno di una singola cellula (10^3 - 10^4 copie), permettendo così

di avere una quantità di materiale genetico molto maggiore rispetto al DNA nucleare. Inoltre il mtDNA, essendo meno deteriorabile, è possibile estrarlo direttamente dal prelievo fissato in formalina, permettendo anche l'analisi di campioni prelevati anni addietro. L'altra caratteristica che lo rende un marker favorevole per l'indagine di clonalità è l'omoplasma. Una cellula figlia derivante da una cellula madre ha un'altissima probabilità di avere lo stesso corredo genetico mitocondriale, vista l'alta stabilità del mtDNA. In letteratura sono presenti numerosi studi che utilizzano il DNA mitocondriale per stabilire la clonalità di neoplasie multiple. Nello specifico, tale metodica è stata già utilizzata in neoplasie di organi quali la mammella e il polmone [205-207], nel carcinoma epatocellulare multicentrico [208] e delle lesioni preneoplastiche dello stomaco [209]. Nel cavo orale, il gruppo di ricerca di Bologna lo ha utilizzato per la prima volta in 3 rari casi di secondi tumori insorti su innesto di cute utilizzato per colmare il gap chirurgico dopo intervento chirurgico di resezione tumorale, per valutare se la manifestazione tumorale insorta su lembo di cute appartenesse o meno al tumore primitivo [210]. Nel 2014 è stato pubblicato su Head & Neck un secondo lavoro che è andato ad analizzare 20 pazienti con seconde o terze manifestazioni tumorali tutte a partenza dal cavo orale. In questo lavoro sono stati confrontati i risultati ottenuti mediante l'analisi del mtDNA rispetto alla classificazione clinica e istologica di Hong et al. [171]. I risultati del lavoro hanno evidenziato un totale accordo tra analisi del mtDNA e criteri istologici, mentre hanno evidenziato una discrepanza in 4 casi su 6 dove la distinzione tra RL e STP era data solo da criteri clinici di spazio e tempo.

Nel presente lavoro invece si è andati a studiare la relazione di clonalità esistente tra un gruppo di pazienti affetti da CSO primitivo e che hanno sviluppato una ML. La comparsa di una ML è una delle variabili più importanti nella prognosi del paziente affetto da CSO [211]. Solitamente queste metastasi sono chiaramente correlate con la presenza del CSO primitivo e vengono diagnosticate in contemporanea con la diagnosi del CSO primitivo. Esistono però casi in cui la metastasi compare dopo molto tempo rispetto al CSO primitivo (metastasi metacrona) o addirittura in assenza di una chiara lesione a livello mucoso. Alcuni autori hanno mostrato come il 3-9% di ML diagnosticate nel distretto testa-collo non presentano una chiara diagnosi della zona di origine [211-212].

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la relazione clonale in una serie di pazienti affetti da CSO e da ML sincrone e/o metacrone mediante l'utilizzo di due metodiche di clonalità: l'analisi delle mutazioni di TP53 e l'analisi delle mutazioni della regione D-loop del mtDNA.

Materiali e metodo

La popolazione di studio consiste in 10 pazienti consecutivi con diagnosi di CSO e ML, trattati presso il reparto di Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Università degli Studi di Bologna, durante il periodo che è andato dal 1 Gennaio 2012 e Dicembre 2013.

I criteri di inclusione del presente studio consistevano in:

- 1- Pazienti che si sono sottoposti ad intervento chirurgico per dissezione linfonodale del collo con diagnosi di carcinoma squamoso metastatico.
- 2- Una anamnesi medica, esame obiettivo e panendoscopia diagnostica presente e dimostrabile.
- 3- Esami strumentali come Tomografia Computerizzata (TC) o Risonanza Magnetica (RM), radiografia del torace e PET-TC total body, quando indicata.

Il trattamento è consistito in una resezione composta, comprendente l'escissione chirurgica del tumore primitivo insieme con la dissezione omolaterale o bilaterale del collo. La dissezione dei linfonodi del collo è stata monolaterale in 8 casi e bilaterale nei restanti 2 casi. Resezione modificata (Modified Radical NeckDissection: MRND) è stata effettuata in 8 pazienti mentre una resezione radicale (Radical NeckDissection RND) in 1 paziente. Il paziente rimanente ha avuto una resezione radicale estesa (Extended Radical NeckDissection ERND). Le metastasi sono state classificate come sincrone quando diagnosticate e rimosse nello stesso momento dell'asportazione del tumore primitivo, metacrone quando diagnosticate 1 o più mesi dopo il tumore primitivo.

Tutti i tessuti sono stati inviati per l'Analisi istologica presso la sezione di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Bologna, Ospedale Bellaria e Ospedale Sant'Orsola. Tutti i tessuti sono stati fissati in formalina e paraffinati come da protocollo. La diagnosi istologica è stata fatta seguendo i criteri proposti dall'OMS [190].

Microdissezione ed estrazione del DNA

Sezioni di 10 µm che mostravano più dell'80% di cellule neoplastiche sono state in toto processate per l'estrazione del DNA. I casi rimanenti sono stati macro o microsezionati per ottenere una popolazione omogenea di cellule tumorali e mucosa sana. La micro sezione è stata eseguita tramite l'uso del laser SL µcut Microtest (MMI GmbH distributed by Nikon, <http://www.mmi-micro.com>). Per ogni lesione sono state selezionate alcune cellule appartenenti alla mucosa sana come controllo dell'analisi del DNA mitocondriale. Il DNA è

stato purificato mediante l'utilizzo del kit d'estrazione QuickExtract™ FFPE DNA (Epicentre, Madison, WI) seguendo le istruzioni dell'operatore.

Analisi e sequenziamento del DNA mitocondriale

Il sequenziamento della regione D-loop del DNA mitocondriale è stato ottenuto mediante piattaforma 454 (GSJunior, Roche, Branford, CT). L'analisi della sequenza D-loop del mtDNA è stata eseguita amplificando 4 frammenti analizzando l'intera regione tra la posizione 15995 e la 700, secondo i criteri di Anderson e al. [213] e come descritto nello human mitochondrial database (NC_012920 gi:251831106, MITOMAP: a Human MitochondrialGenome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, <http://www.mitomap.org>).

I primer sono stati disegnati usando primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e le loro sequenze come è stato riportato in precedenti lavori [213]. Per generare gli ampliconi per la 454 NGS library, primer di fusione sono stati disegnati allo scopo di ottenere specifici primer per mtDNA, le sequenze di adattamento A e B e la sequenza chiave per 454 NGS e 1 di 14 differenti 10 bp multiplex identifier (MID) codici, in accordo con il metodo di sequenziamento standard GS FLX.

I prodotti ottenuti dalla PCR sono stati purificati usando AmpPure kit (Agencourt, Beverly, MA). La sequenza di DNA è stata analizzata bidirezionalmente usando il sequenziatore GSJunior (Roche, Branford, CT) con una soglia di almeno 10 reads mutate seguendo AmpliconVariant Analyzer software 2.7.

In base ai dati ottenuti dalle diverse lesioni e dalle diverse porzioni di tessuto sano, le sequenze sono state appaiate e, tramite la versione 5.2 del software MEGA (<http://www.megasoftware.net>) [214-216], sono stati creati gli alberi filogenetici utilizzando come parametri Kimura-2 con il modello Gamma [217]. Ogni albero è stato testato per l'errore standard dal metodo Bootstrap [218].

Risultati

Dati clinici

La popolazione iniziale di studio consisteva in 10 pazienti affetti da CSO e corrispettiva ML. L'analisi delle sequenze di mtDNA D-loop e TP53 non è stato possibile eseguirla in 2 casi per problemi di fissazione del materiale in formalina. La popolazione di studio consiste in 8 pazienti (5 maschi e 3 donne, età 53-76, media 67). Le caratteristiche cliniche e di trattamento di ogni paziente sono state riassunte in TABELLA 14.

Pz.	Età	Sesso	Fumo	TNM	Sede Tumore primitivo	Dissezione	Metastasi Linfonodale (tempo)
Caso 1	53	M	No	T4N2a	Regione retro molare	MRND	Sincrona
Caso 2	72	F	No	T2N1	Gengiva	MRND	Sincrona
Caso 3	76	F	No	T2N1	Guancia	MRND	Metacrona (5 mesi dopo)
Caso 4	71	F	No	T4N2a	Pavimento cavo orale	MRND	Sincrona
Caso 5	70	M	Si	T4N2c	Lingua	MRND	2 sincrone
Caso 6	65	M	Si	T2N2b	Lingua	ERND	Sincrona e metacrona (20 mesi dopo)
Caso 7	53	M	Si	T1N2b	Guancia	RND	Sincrona e metacrona (11 mesi dopo)
Caso 8	73	M	No	T4N2a	Gengiva	MRND	Sincrona

Tabella 14

4 degli 8 pazienti analizzati (50%) ha avuto solo una ML simultanea rispetto a CSO (casi 1,2,4,8). Un paziente (caso 5) ha avuto 2 ML sincrone. 2 pazienti su 8 (25%) hanno avuto una ML sincrona e metacrona (caso 6, 7) mentre in un caso (caso 3) c'è stata solo una metastasi metacrona.

Le ML metacrone sono apparse dopo un lasso di tempo che varia dai 5 ai 20 mesi (media 12 mesi) rispetto alla diagnosi del tumore primitivo.

Un paziente trattato per un CSO della lingua ha presentato inizialmente una ML sincrona, una metastasi linfonodale paratracheale 20 mesi dopo il tumore primitivo. Lo stesso paziente ha poi presentato un secondo tumore ai polmoni che ha portato a decesso (caso 6).

Un altro paziente trattato per carcinoma della guancia e ML sincrona, ha presentato una metastasi metacrona sovra mandibolare 11 mesi dopo il primo intervento chirurgico (caso 7).

Analisi della regione D-loop del DNA mitocondriale e delle mutazioni di TP53

Caso 1: maschio; età: 53; non fumatore; T4N2bM0;

K1D: caso 1, displasia;

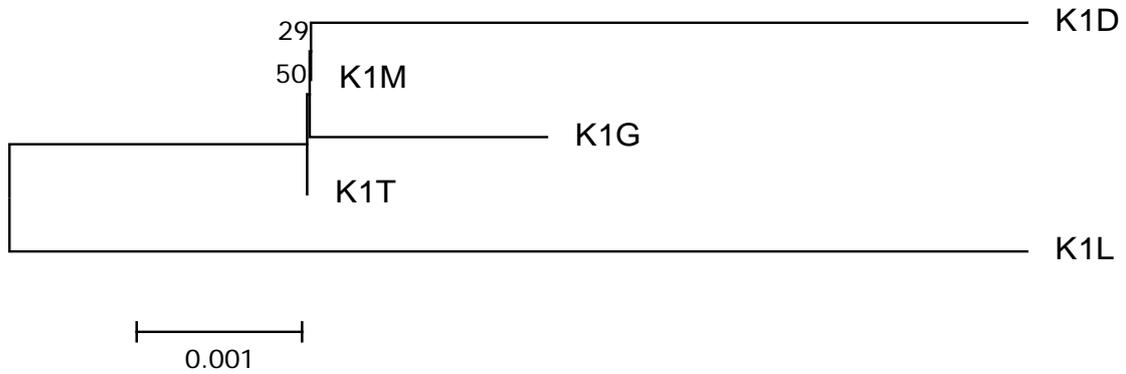
K1M: caso 1, metastasi linfonodale;

K1G: caso 1, ghiandola salivare;

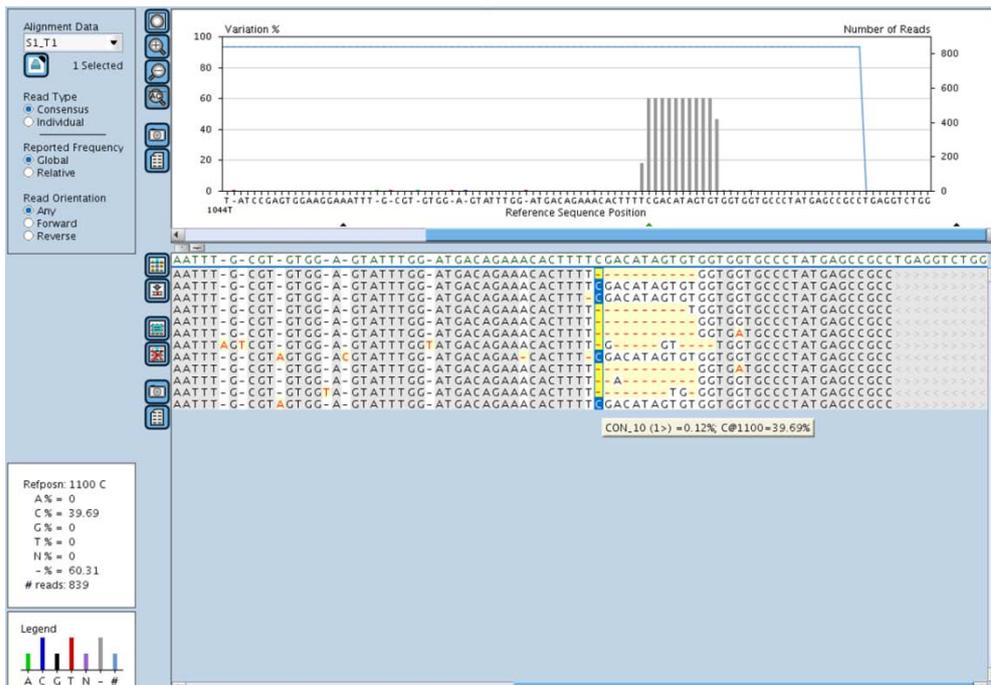
K1T: caso 1, tumore primitivo;

K1L: caso 1, linfonodo libero da malattia

Alberofilogenetico



TP53, esone 6 del tumore primitivo: l'analisi mediante next generation sequencing ha rilevato la presenza della delezione "p.R213fs*11".



Case 2: donna; età: 72; non fumatrice; T2N1M0; dissezione linfonodale: MRND; metastasi sincrona;

mtDNA Neighbor Joining Tree:

K3D: caso 2, displasia;

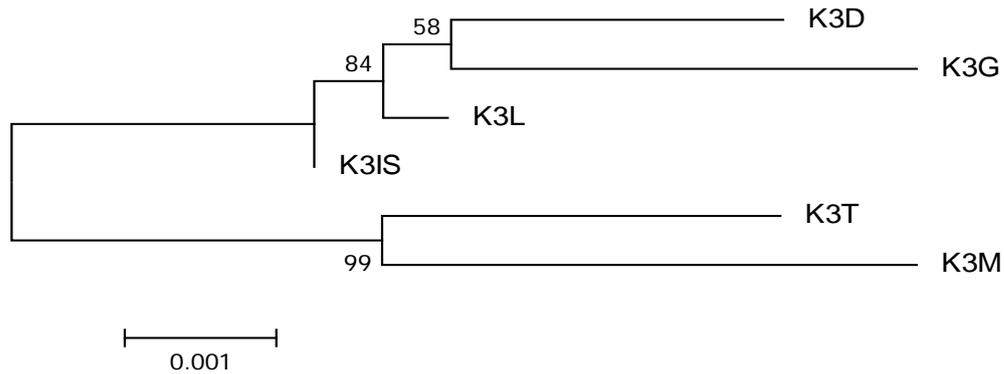
K2M: caso 2, ML;

K2G: caso 2, ghiandola salivare;

K2T: caso 2, tumore primitivo;

K2L: caso 2, linfonodo non metastatico;

K2IS: caso 2, CSO in situ



L'analisi delle mutazioni per TP53 mediante next generation sequencing hanno rilevato assenza di mutazioni.

Caso 3: donna; età: 76; non fumatrice; T2N1M0; dissezione collo MRND; ML apparsa 5 mesi dopo CSO primitivo;

mtDNA Neighbor Joining Tree:

K3D: caso 3, displasia;

K3M: caso 3, ML;

K3G1: caso 3, ghiandola salivare 1;

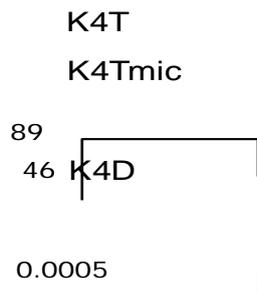
K3G2: caso 3, ghiandola salivare 2;

K3T: caso 3, CSO primitivo;

K3Tmic: caso 3, CSO microinvasivo

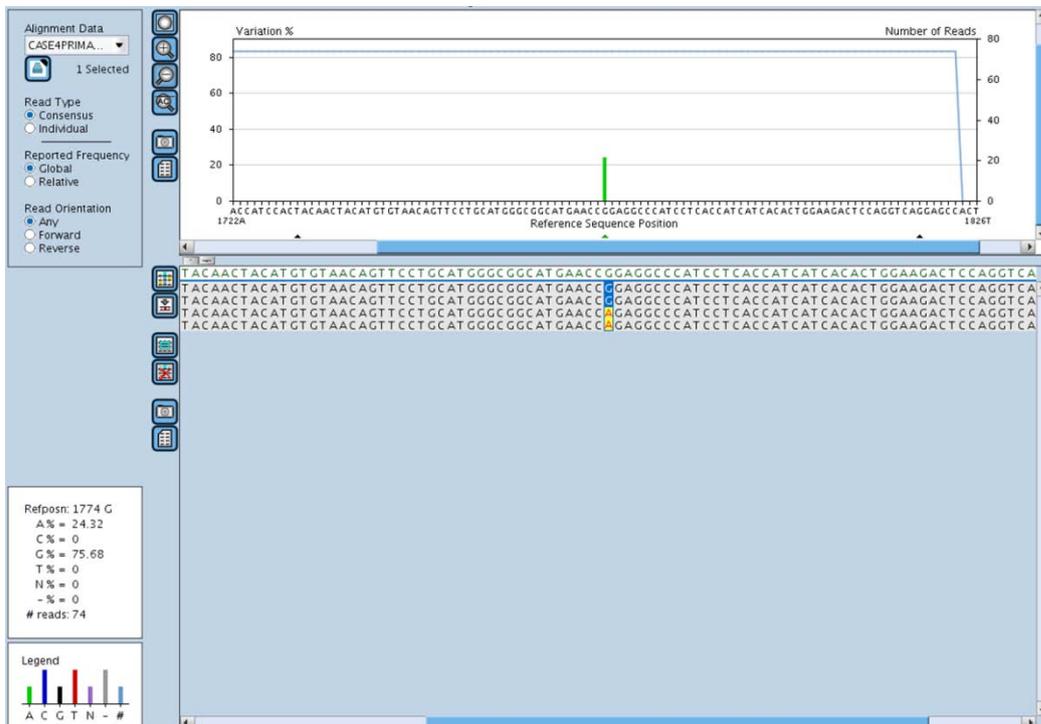
99 K4G1

K4G2

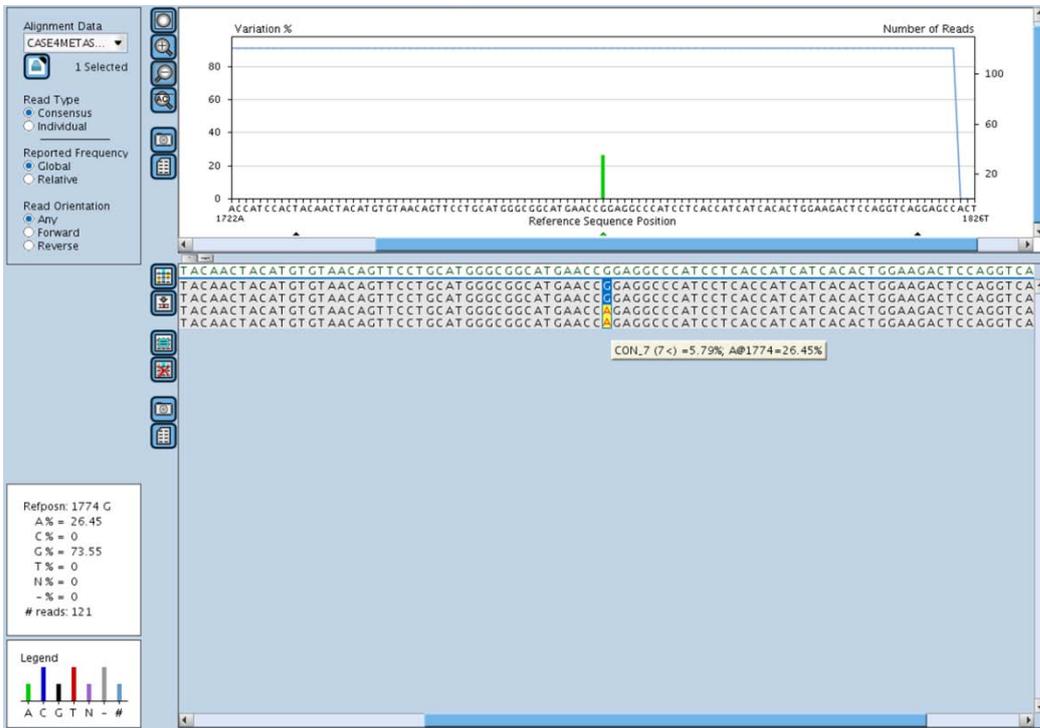
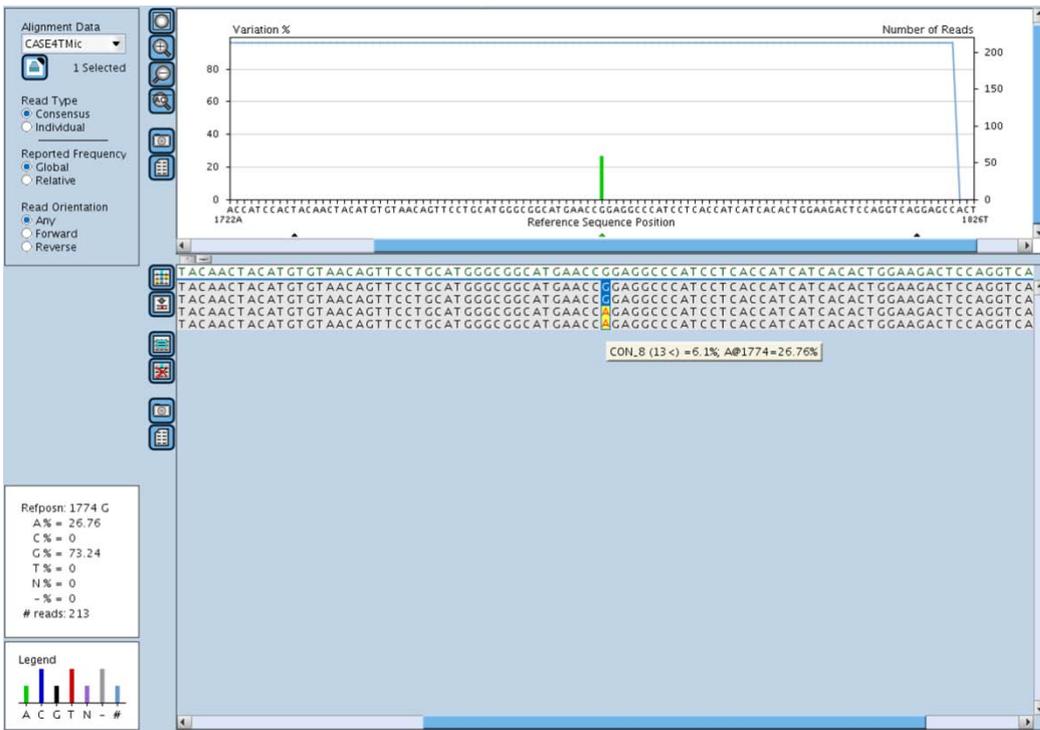


K4M

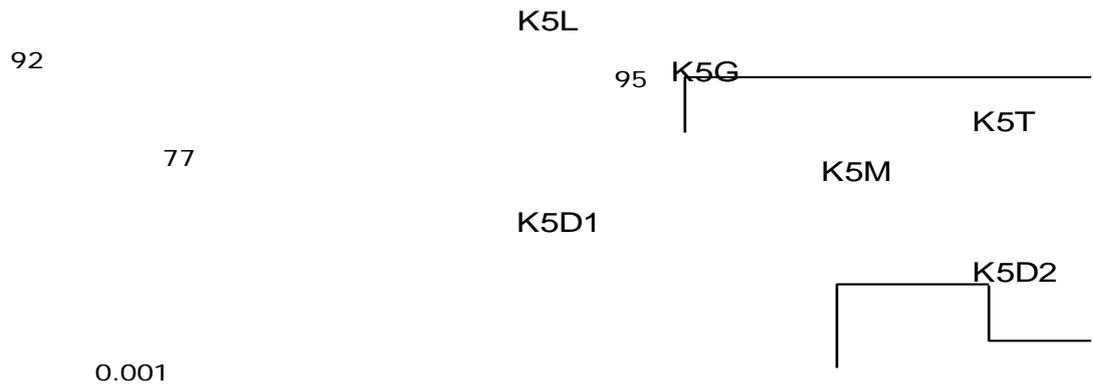
L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing ha rilevato la presenza della seguente mutazione nell'esone 7: p.R248Q.



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing nel CSO microinvasivo e in ML hanno individuato la stessa mutazione del tumore primitive p.R248Q.



Caso 4: donna; età: 71; non fumatrice; T4N2aM0; dissezione linfonodi MRND; ML sincrona;
 mtDNA Neighbor Joining Tree:
 K5D1: caso 4, displasia 1;
 K4D2: caso 4, displasia 2;
 K4M: caso 4, ML;
 K4G: caso 4, ghiandola salivare;
 K4T: caso 4, CSO primitivo;
 K4L: caso 4, linfonodo non metastatico;
 K4G: caso 4, ghiandola salivare



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing non ha rilevato la presenza di mutazioni.

Caso 5: maschio; età: 70; fumatore; T4N2cM0; dissezione collo: MRND; ML sincrona; mtDNA

Neighbor Joining Tree:

K5D: caso 5, displasia;

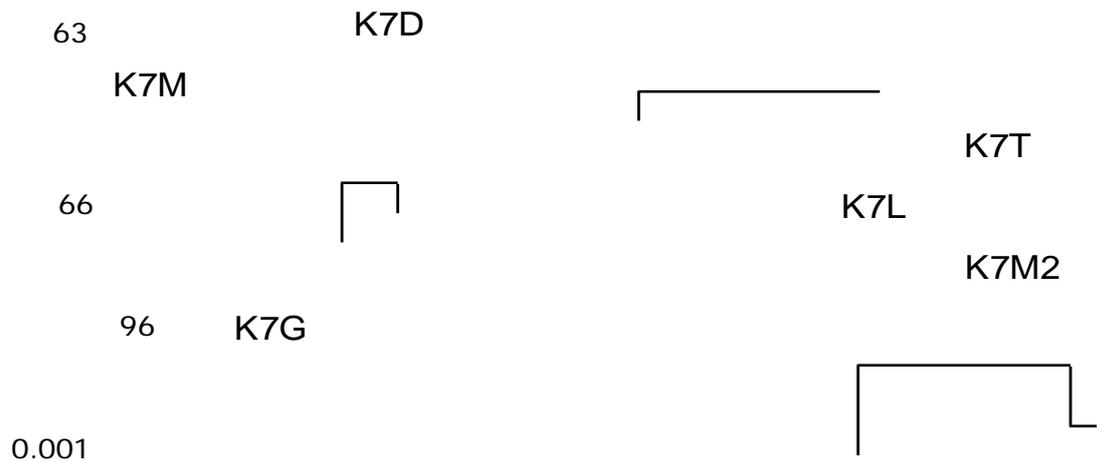
K5M: caso 5, ML sincrona omolaterale;

K5M2: caso 5ML sincrona controlaterale;

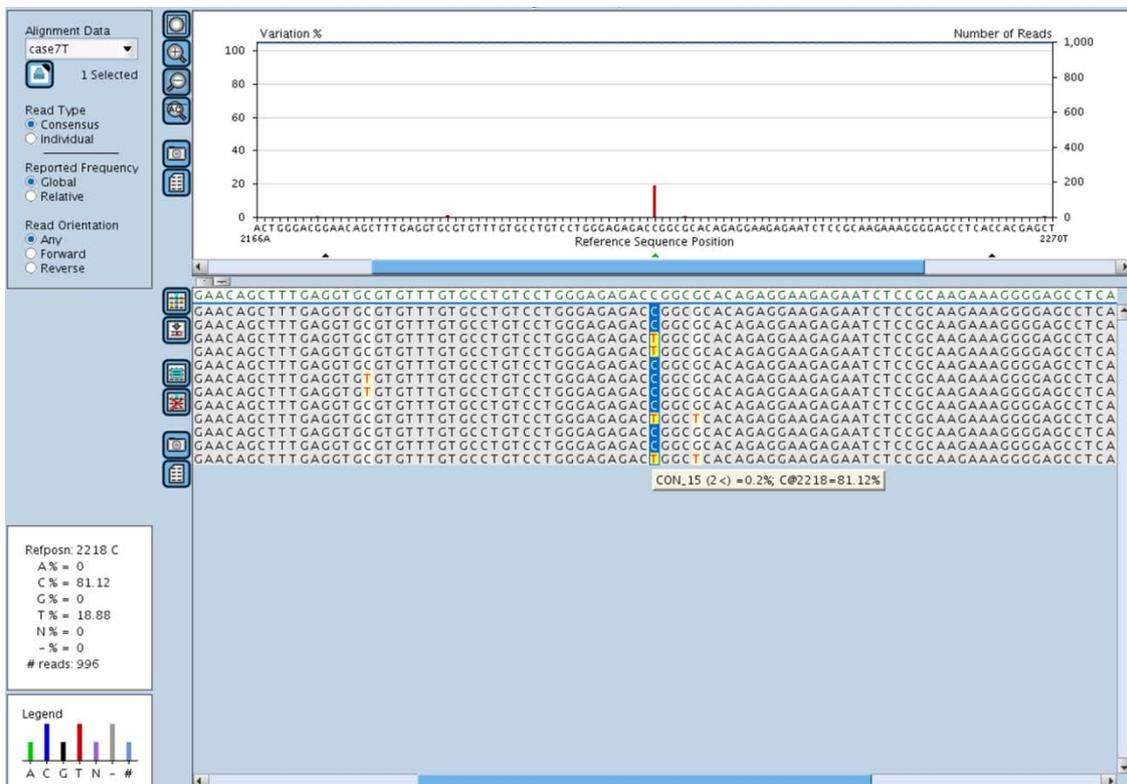
K5G: caso 5, ghiandola salivare;

K5T: caso 5, CSO primitivo;

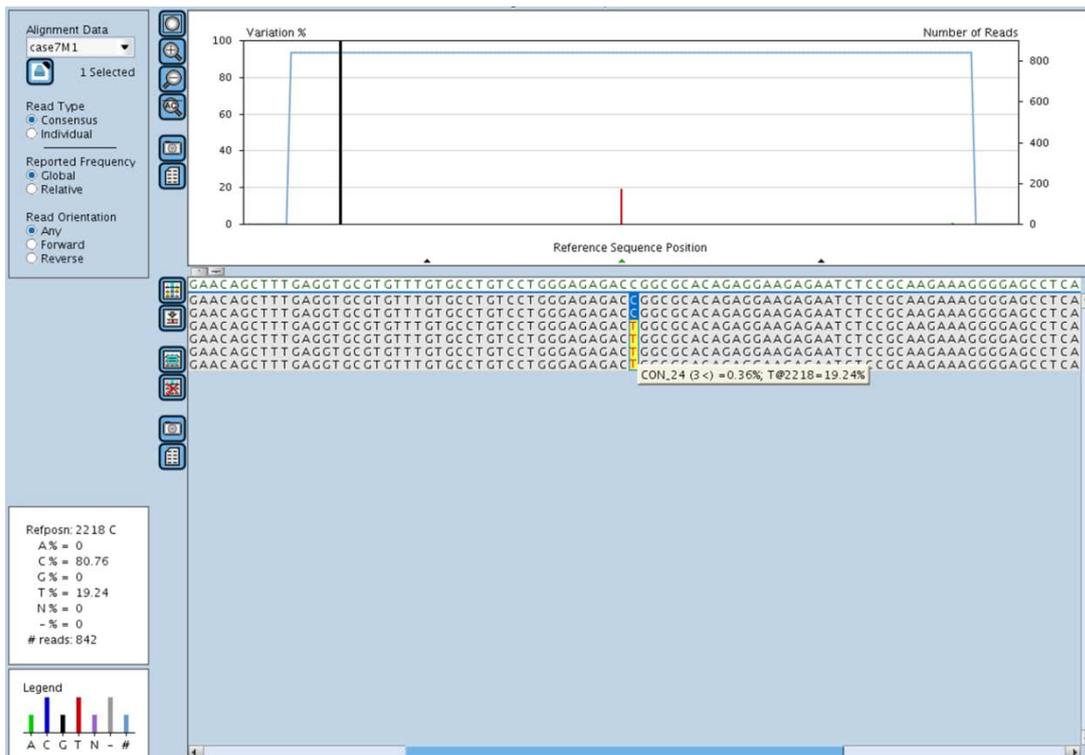
K5L: case 5, linfonodo non metastatico



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing ha rilevato nel CSO primitivo la presenza della seguente mutazione nell'esone 8: p.R282W



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing ha rilevato in ML la presenza della stessa mutazione nell'esone 8: p.R282W



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing nella ML metacrona ha rilevato un'assenza di mutazioni per TP53.

Caso 6: maschio; età: 65; fumatore; T2N2bM1 (metastasi a IV livello e in regione pre-tracheale); dissezione linfonodale: ERND; ML metacrona(20 mesi dopo CSO primitivo);

mtDNA Neighbor Joining Tree:

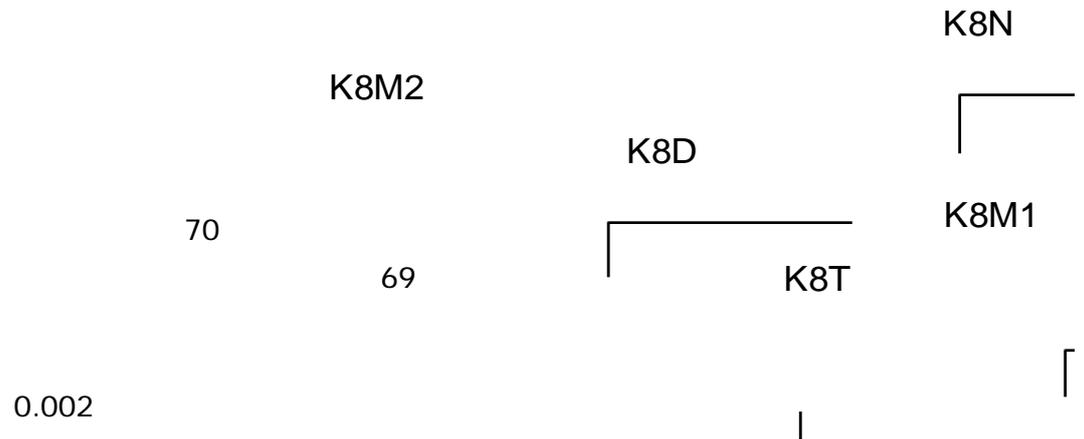
K6D: caso 6, dysplasia;

K6M1: caso 6, ML sincrona;

K6M2: caso 6, ML metacrona

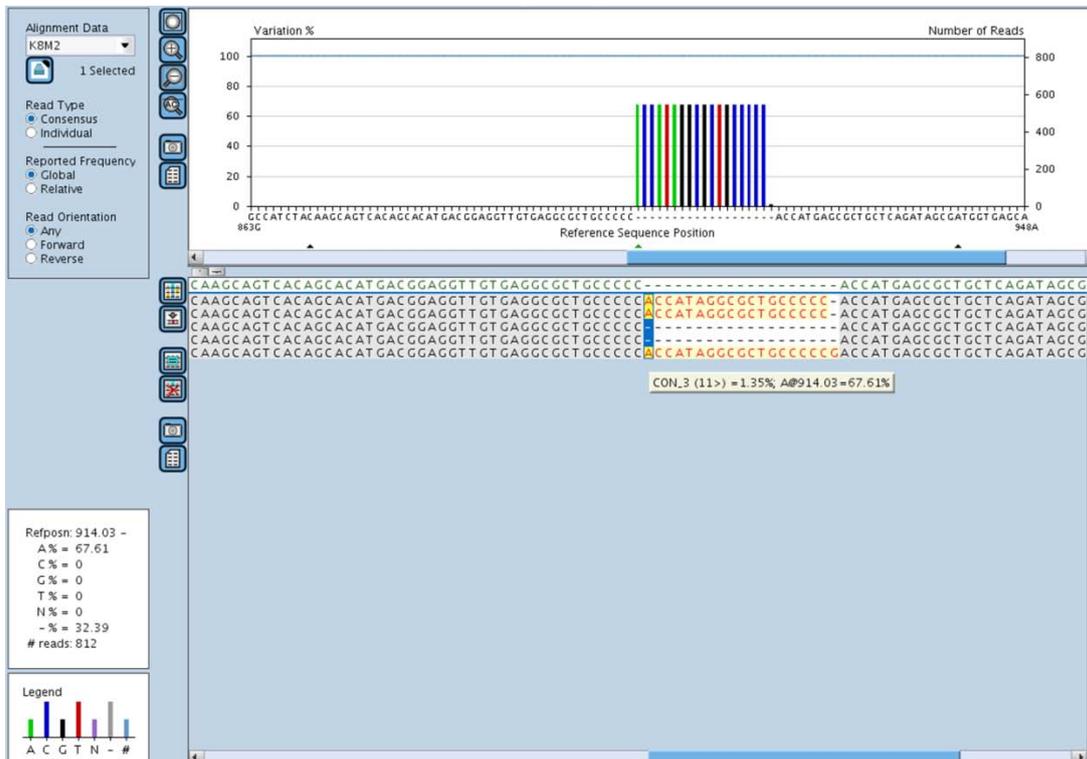
K6T: caso 6, CSO primitive

K6N: caso 6, tessuto epiteliale sano



L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing nel CSO primitivo e nella metastasi sincrona un'assenza di mutazioni.

L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing ha rilevato nella metastasi metacrona la seguente inserzione p.H178fs*19.



Caso 7: uomo; età: 53; non fumatore; T1N2cM0; dissezione collo: RND; ML sincrona e metacrona (11 mesi dopo)

mtDNA Neighbor Joining Tree:

K7M1: caso 7, ML sincrona;

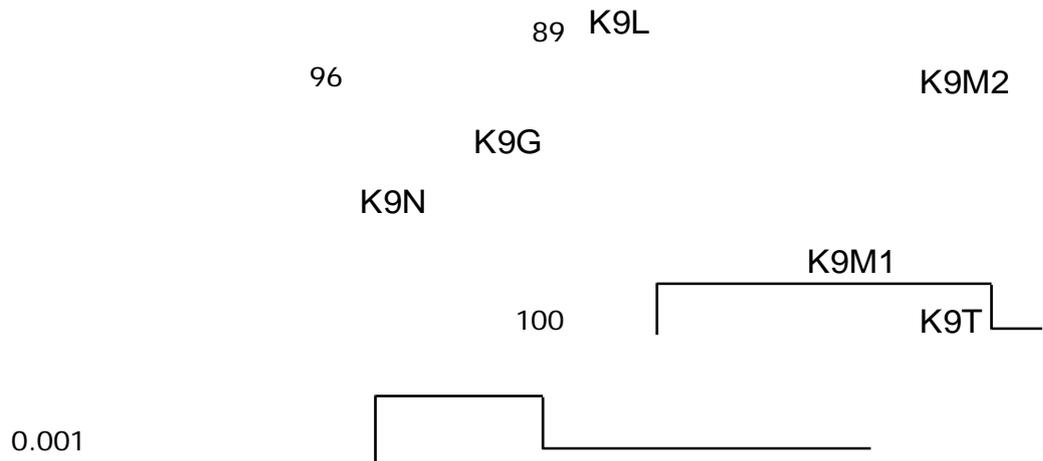
K7M2: caso 7, ML metacrona;

K7T: caso 7, CSO primitivo;

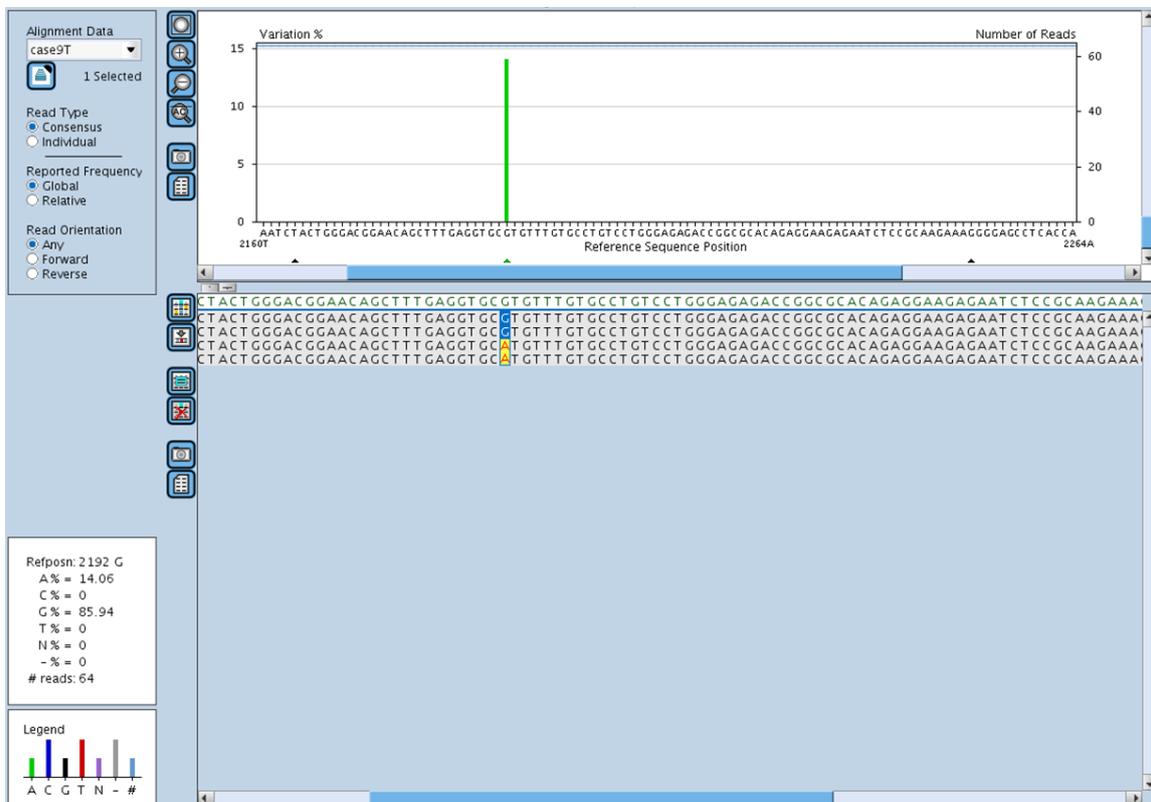
K7L: caso 7, linfonodo non metastatico;

K7G: caso 7, ghiandola salivare;

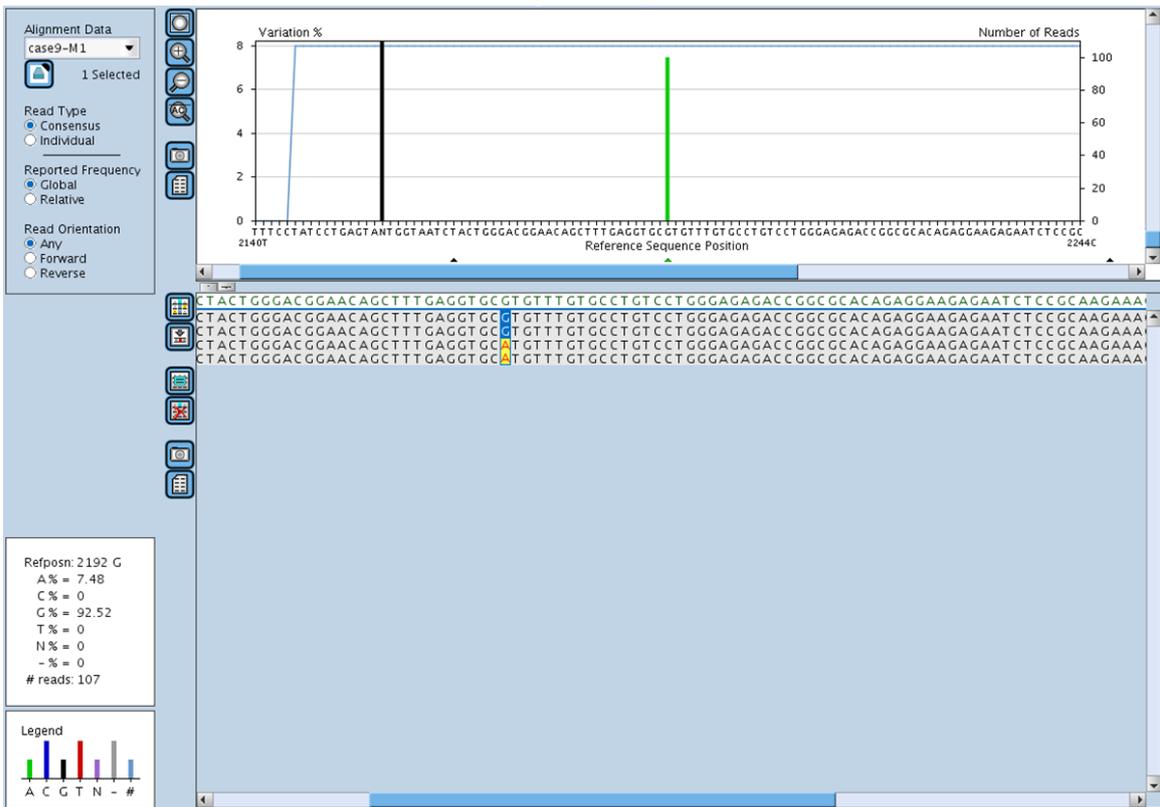
K7N: caso 7, tessuto epiteliale sano



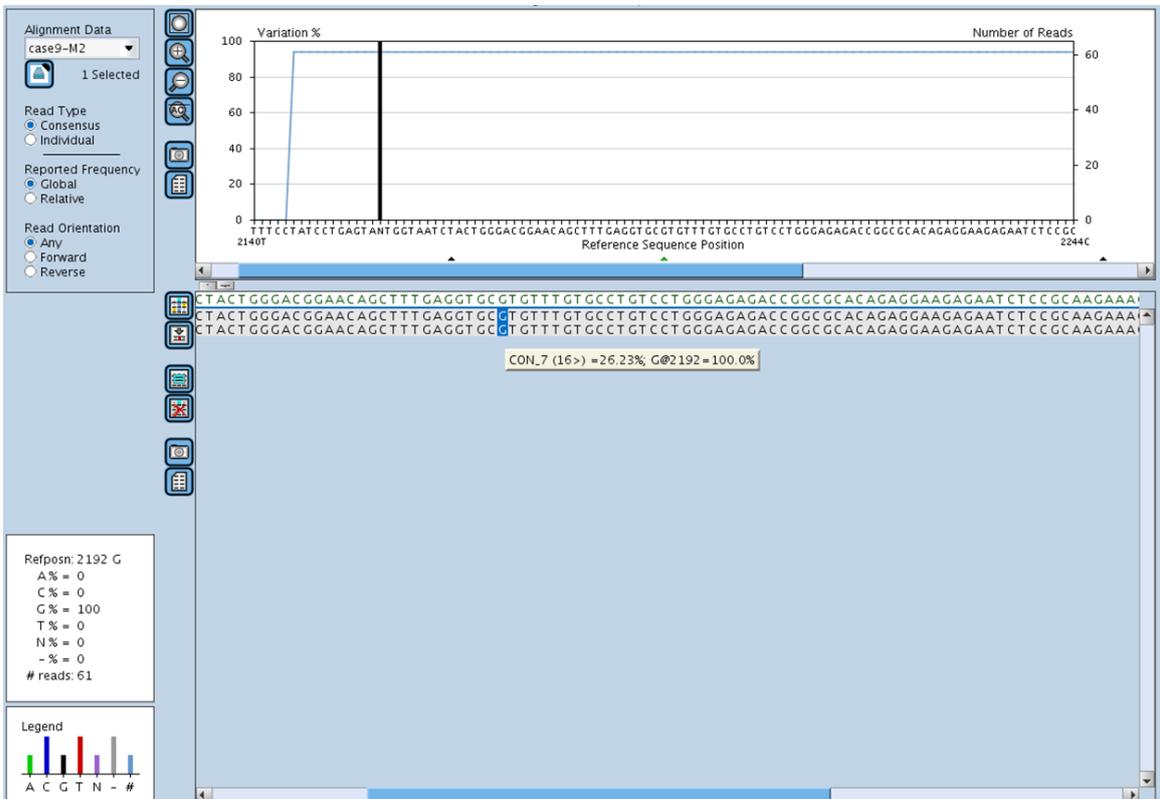
L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing nel CSO primitivo ha permesso di individuare la seguente mutazione nell'esone 8: 8: p.R273H.



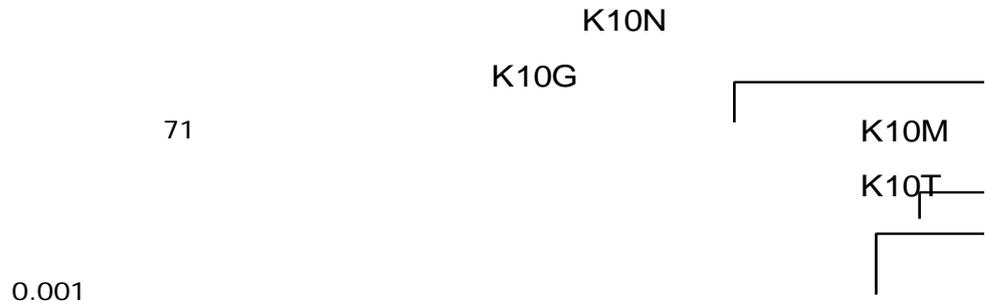
L'analisi di TP53 mediante next generation sequencing nella ML sincrona ha permesso di individuare la stessa mutazione del CSO primitivo: p.R273H.



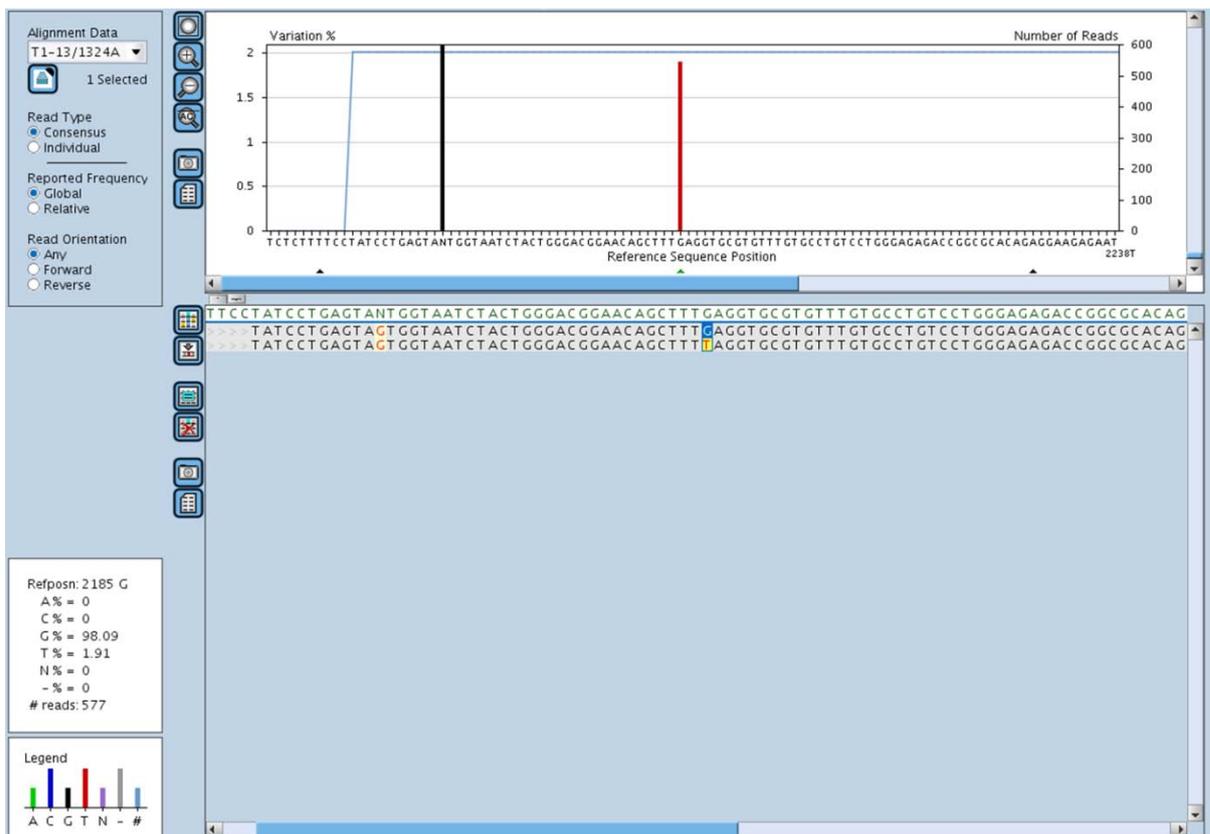
È risultata un'assenza di mutazione di TP53 nella MLmetacrona.



Caso 8: uomo; età: 73; fumatore; T4N2aM0; dissezione collo: MRND; solo ML sincrona;
 mtDNA Neighbor Joining Tree:
 K8M1: caso 8, ML sincrona;
 K8T: caso 8, CSO primitive;
 K8 N: caso 8, tessuto epiteliale normale;
 K8G: caso 8, ghiandola salivare



L'analisi di TP53 mediante Next Generation Sequencing ha individuate nel tumore primitivo la seguente mutazione nell'esone 8: p.E271*.



Non sono state invece rilevate mutazioni nella ML sincrona.

I risultati ottenuti per l'analisi di TP53 e mtDNA sono riassunti in TABELLA 15

Caso	Metodo	HG SIL	CSO primitivo	ML sincrona	ML metacrona	Accordo tra TP53 e mtDNA
Caso 1	TP53	c.638G>T; p.R213L	p.R213fs*11	p.R213fs*11	/	SI
	mtDNA	CLONALE	CLONALE	CLONALE	/	
Caso 2	TP53	WT	WT	WT	/	TP53 non informativa
	mtDNA	CLONALE	CLONALE	CLONALE	/	
Caso 3	TP53	WT	7: p.R248Q	/	7: p.R248Q	Disaccordo solo nel confronto HG SIL TP53
	mtDNA	CLONALE	CLONALE	/	CLONALE	
Caso 4	TP53	WT	WT	WT	/	TP53 non informativa
	mtDNA	NON CLONALE	CLONALE	CLONALE	/	
Caso 5	TP53	c.844C>T; p.R282W	c.844C>T; p.R282W	1) c.844C>T; p.R282W 2) WT	/	SI
	mtDNA	CLONALE	CLONALE	1) CLONALE 2) NON CLONALE	/	
Caso 6	TP53	WT	WT	WT	c.533_534ins ACCATAGGCGCTGCCCCC; p.H178_H179insTIGAAP	SI
	mtDNA	CLONALE	CLONALE	CLONALE	NON CLONALE	
Caso 7	TP53	/	c.818G>A; p.R273H	c.818G>A; p.R273H	WT	SI
	mtDNA	/	CLONALE	CLONALE	NON CLONALE	
Caso 8	TP53	/	c.811G>T; p.E271*	WT	/	SI
	mtDNA	/	NON CLONALE	NON CLONALE	/	

Tabella 15

Analisi di TP53

HG SIL: mutazioni per TP53 sono state identificate in 2 su 8 HG SIL (25%). Il caso 5 ha mostrato la stessa mutazione anche in CSO e in ML; nel caso 1 invece è stata identificata una singola mutazione puntiforme (c.638G>T;p.R213L) nello stesso locus da dove è poi partita la delezione caratteristica di CSO e ML. In tutti i casi ha mostrato un pattern di mutazione simile al CSO primitivo.

CSO: mutazioni di TP53 sono state identificate in 5 casi su 8 (62,5%).

ML sincrone: mutazioni di TP53 sono state identificate in 3 casi su 8 (33,3%). In 6 casi su 8 (77,7%) ha mostrato un pattern di mutazione simile al CSO primitivo.

ML metacrone: 2 casi su 3 hanno mostrato mutazioni di TP53 (66,6%). Solo in 1 caso su 3 si è avuto accordo con il pattern di mutazione del CSO primitivo.

Analisi di clonalità mediante analisi regione D-loop mtDNA

HG SIL: 4 casi su 6 sono risultati clonali rispetto a CSO primitivo (66,6%).

ML sincrone: 6 casi su 8 sono risultati clonali rispetto al CSO primitivo (77,7%).

ML metacrone: 1 caso su 3 è risultato clonale rispetto a CSO primitivo (33,3%).

Confronto tra mutazioni di TP53 e analisi di mtDNA

Un quasi completo accordo è stato individuato tra mutazioni di TP53 e analisi di mtDNA nei 5 casi in cui TP53 è risultata una metodica informativa per lo studio di clonalità. L'unica eccezione è risultata il caso 3 in cui CSO è risultato non clonale rispetto al carcinoma microinvasivo per mtDNA, mentre TP53 ha individuato lo stesso pattern di mutazioni.

Discussione

La possibilità di sviluppare una ML dopo iniziale terapia per CSO varia dal 14% al 62%[219]. L'incidenza di una ML di origine non nota è direttamente correlata con lo stadio del tumore (soprattutto presente nei T4 e negli N2 e N3). Nonostante risulti la maggior variabile correlata con una prognosi infausta, raramente sono state eseguite studi molecolari su ML e non si hanno molte informazioni relativamente a l'eterogeneità tumorale in un paziente con lesioni multiple. Basandosi su un modello classico di evoluzione tumorale una metastasi trae origine da un singolo clone presente nel tumore primitivo, ma i dati sperimentali a conferma di ciò non sono molti. Nella nostra casistica è stata analizzata la relazione clonale presente tra HG SIL, CSO primitivo e ML sincrone e metacrone utilizzando 2 metodiche di clonalità.

Nella nostra casistica 2 delle 8 ML sincrone sono risultate non clonali rispetto al CSO primitivo (caso 5 ML2 e caso 8). La spiegazione di questo risultato potrebbe essere data dalla presenza di un carcinoma occulto o alla presenza di eterogeneità tumorale. Infatti, sebbene tutte le cellule tumorali derivano da un progenitore comune, le cellule figlie continuano ad evolvere. L'evoluzione può portare alla formazione di subcloni e la distanza genetica tra cellula progenitrice e subcloni può essere rappresentata dall'eterogeneità. Tumori di grandi dimensioni (T4) possono contenere più facilmente subcloni, oltre ad essere maggiormente predisposti a sviluppare metastasi, resistenza alla terapia e prognosi infausta. Nella nostra casistica effettivamente i casi 5 e 8 sono entrambi tumori di grandi dimensioni (rispettivamente T4N2c e T4N2a). E' interessante il caso 5, dove sono presenti 2 metastasi sincrone, 1 comparsa nella zona omolaterale rispetto al CSO primitivo e che presenta la stessa mutazione per TP53 (p.R282W) nell'esone 8 e clonalità per mtDNA. La seconda metastasi invece apparsa nello stesso periodo ma in zona contro laterale rispetto al CSO primitivo risulta invece non avere mutazioni per TP53 e non clonale per mtDNA. Tutte le indagini volte alla ricerca di un tumore occulto sono risultate negative quindi potrebbe effettivamente trattarsi di un sub clone responsabile della seconda metastasi. Questo potrebbe essere ancora più chiaro per il caso 8, dove una ML sincrona risulta non clonale per mtDNA rispetto al CSO primitivo e risulta perdere la mutazione per TP53 che invece era presente nel CSO primitivo.

Casi di ML non clonali sono state rilevate in percentuale maggiore in ML metacrone. Il caso 6 ha avuto una metastasi non clonale in zona pre-tracheale apparsa 20 mesi il CSO primitivo. In questo caso è stato diagnosticato un secondo tumore ai polmoni che potrebbe giustificare la comparsa di ML metacrona non appartenente al CSO primitivo.

Il caso 7 invece riporta una ML metacrona (comparsa 11 mesi dopo) non clonale per mtDNA e che ha perso la mutazione per TP53 che era presente nel CSO primitivo. L'ipotesi di eterogeneità potrebbe anche in questo caso giustificare il risultato dato dalle 2 metodiche di clonalità.

Considerando invece le HG SIL, 5 casi su 7 analizzati hanno effettivamente mostrato una stretta relazione genetica con il CSO e la relativa ML, questo data, pur considerando il numero estremamente ridotto della casistica, però conferma come HG-SIL risulti come diretto precursore del CSO primitivo.

Altro dato interessante è il completo accordo risultato dalle 2 metodiche di clonalità utilizzate per analizzare la casistica. L'analisi delle mutazioni di TP53 è la metodica di analisi

maggiormente applicata in letteratura per studiare la relazione clonale tra CSO e ML [167, 220]. Presenta però dei limiti. Nel CSO mutazioni per TP53 sono presenti nel 50-90% dei casi, quindi quando non presente la metodica rischia di essere non informativa, inoltre nel 6-9% dei casi esiste il rischio che stesse mutazioni possano essere casualmente presenti in manifestazioni tumorali diverse [166]. Questi limiti hanno portato molti autori ad utilizzare TP53 non come unico marker di clonalità ma affiancato ad un'altra metodica [167, 178, 192, 221].

Nella nostra casistica l'analisi delle mutazioni di TP53 in 2 casi su 8 non ha fornito informazioni utili perché HG SIL, CSO e ML non presentavano mutazioni per tale gene e in questi casi l'analisi di mtDNA si è rivelata una metodica maggiormente informativa.

Conclusioni

I dati, pur considerando il basso numero di pazienti del presente studio, sembrano mostrare come l'analisi di mtDNA e TP53 siano in grado di fornire informazioni aggiuntive in relazione all'origine di seconde manifestazioni tumorali. Le 2 metodiche risultano in accordo nei risultati e mtDNA in alcuni casi è una metodica in grado di fornire informazioni aggiuntive rispetto a l'analisi di TP53.

L'analisi di clonalità di seconde manifestazioni tumorali nella pratica clinica potrebbe aiutare ad orientare in maniera più corretta la diagnosi, la prognosi e la terapia del paziente affetto da CSO.

BIBLIOGRAFIA

1. Mao, L., W.K. Hong, and V.A. Papadimitrakopoulou, *Focus on head and neck cancer*. Cancer Cell, 2004. **5**(4): p. 311-6.
2. Parkin DM, W.S., Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (2003). Cancer incidence in five continents. Vol VIII. IARC Press:Lion.
3. Morse, D.E., et al., *Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia*. Cancer Causes Control, 2007. **18**(9): p. 919-29.
4. Yen, A.M., et al., *The effect of betel quid and cigarette on multistate progression of oral pre-malignancy*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(7): p. 417-22.
5. Yen, T.T., et al., *The association of smoking, alcoholic consumption, betel quid chewing and oral cavity cancer: a cohort study*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008. **265**(11): p. 1403-7.
6. Italia:, M.d.s., *Documento tecnico di indirizzo per ridurre il carico di malattia del cancro per il 2011-2013*.
7. Gillison, M.L., *Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers*. Head Neck, 2007. **29**(8): p. 779-92.
8. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
9. Mathers, C.D., et al., *Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: I. Application of regional cancer survival model to estimate cancer mortality distribution by site*. BMC Cancer, 2002. **2**: p. 36.
10. Berrino, F., *The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies*. Ann Oncol, 2003. **14 Suppl 5**: p. v9-13.
11. Bell, R.B., et al., *Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity?* J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(2): p. 229-36.
12. Kademani, D., et al., *Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade*. J Oral Maxillofac Surg, 2005. **63**(11): p. 1599-605.
13. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2488-92.

14. Rogers, S.N., et al., *An assessment of deprivation as a factor in the delays in presentation, diagnosis and treatment in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2007. **43**(7): p. 648-55.
15. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. CA CANCER J CLIN, 2002. **52**(4): p. 195-215.
16. Mashberg, A., et al., *Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans*. Cancer, 1993. **72**(4): p. 1369-75.
17. Moreno-Lopez, L.A., et al., *Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain*. Oral Oncol, 2000. **36**(2): p. 170-4.
18. Wynder, E.L., M.H. Mushinski, and J.C. Spivak, *Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers*. Cancer, 1977. **40**(4 Suppl): p. 1872-8.
19. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, *Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence*. Oral Oncol, 2005. **41**(3): p. 244-60.
20. Lee, C.H., et al., *Betel-quid dependence and oral potentially malignant disorders in six Asian countries*. Br J Psychiatry, 2012. **201**(5): p. 383-91.
21. Andre, K., et al., *Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1995. **31B**(5): p. 301-9.
22. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
23. Ogden, G.R., *Alcohol and oral cancer*. Alcohol, 2005. **35**(3): p. 169-73.
24. Pfister, H., et al., *Classification of the papillomaviruses--mapping the genome*. Ciba Found Symp, 1986. **120**: p. 3-22.
25. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
26. Nair, S. and M.R. Pillai, *Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers*. Oral Dis, 2005. **11**(6): p. 350-9.
27. Klaes, R., et al., *p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(11): p. 1389-99.

28. Klaes, R., et al., *Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri*. Int J Cancer, 2001. **92**(2): p. 276-84.
29. Thompson, I.O., et al., *A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium*. Arch Oral Biol, 2001. **46**(12): p. 1091-8.
30. Cao, J., et al., *Human papillomavirus infection and p53 alteration in oral squamous cell carcinoma*. Chin J Dent Res, 2000. **3**(3): p. 44-9.
31. Patiman, Z. Zhang, and J. Cao, *[Research on expression of human papillomavirus type 16 and telomerase in oral lesions]*. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2001. **36**(2): p. 119-21.
32. Giovannelli, L., et al., *Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 833-6.
33. da Silva, C.E., et al., *Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **104**(4): p. 497-500.
34. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 467-75.
35. Miller, C.S. 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, 2001. **91**(6): p. 622-35.
36. Syrjanen, S., et al., *Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review*. Oral Dis, 2011. **17 Suppl 1**: p. 58-72.
37. Lingen, M.W., et al., *Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 2013. **49**(1): p. 1-8.
38. Herrero, R., et al., *Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(23): p. 1772-83.
39. Tachezy, R., et al., *Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors*. J Med Virol, 2009. **81**(5): p. 878-87.
40. Scapoli, L., et al., *Low prevalence of human papillomavirus in squamous-cell carcinoma limited to oral cavity proper*. Mod Pathol, 2009. **22**(3): p. 366-72.

41. McDowell, J.D., *An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Clin North Am, 2006. **39**(2): p. 277-94.
42. Rennemo, E., U. Zatterstrom, and M. Boysen, *Impact of second primary tumors on survival in head and neck cancer: an analysis of 2,063 cases*. Laryngoscope, 2008. **118**(8): p. 1350-6.
43. van der Waal, I., et al., *Oral leukoplakia: a clinicopathological review*. Oral Oncol, 1997. **33**(5): p. 291-301.
44. Warnakulasuriya, S., N.W. Johnson, and I. van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(10): p. 575-80.
45. Scheifele, C. and P.A. Reichart, *Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia?* Oral Oncol, 2003. **39**(5): p. 470-5.
46. Waldron, C.A. and W.G. Shafer, *Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias*. Cancer, 1975. **36**(4): p. 1386-92.
47. Reichart, P.A. and H.P. Philipsen, *Oral erythroplakia--a review*. Oral Oncol, 2005. **41**(6): p. 551-61.
48. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 317-23.
49. Hansen, L.S., J.A. Olson, and S. Silverman, Jr., *Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1985. **60**(3): p. 285-98.
50. Cabay, R.J., T.H. Morton, Jr., and J.B. Epstein, *Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(5): p. 255-61.
51. van der Waal, I. and P.A. Reichart, *Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited*. Oral Oncol, 2008. **44**(8): p. 719-21.
52. Cruz, I., et al., *Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland*. J Clin Pathol, 2002. **55**(2): p. 98-104.
53. Scully, C., J. Sudbo, and P.M. Speight, *Progress in determining the malignant potential of oral lesions*. J Oral Pathol Med, 2003. **32**(5): p. 251-6.

54. Gale, N., et al., *Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx*. *Histopathology*, 2009. **54**(6): p. 639-56.
55. Gale, N., et al., *Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions-a proposed unified classification*. *Histopathology*, 2014. **65**(4): p. 456-64.
56. Al-Hashimi, I., et al., *Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007. **103 Suppl**: p. S25 e1-12.
57. Bidarra, M., et al., *Oral lichen planus: a condition with more persistence and extra-oral involvement than suspected?* *J Oral Pathol Med*, 2008. **37**(10): p. 582-6.
58. Scully, C. and M. Carrozzo, *Oral mucosal disease: Lichen planus*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2008. **46**(1): p. 15-21.
59. van der Meij, E.H. and I. van der Waal, *Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications*. *J Oral Pathol Med*, 2003. **32**(9): p. 507-12.
60. Carbone, M., et al., *Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients*. *Oral Dis*, 2009. **15**(3): p. 235-43.
61. Gandolfo, S., M. Carrozzo, and M. Pagano, *Oral lichenoid lesions: what are they?* *Oral Oncol*, 2004. **40**(10): p. 1057-8.
62. Sugerman, P.B., et al., *Kinetics of gene expression in murine cutaneous graft-versus-host disease*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(6): p. 2189-202.
63. Montebugnoli, L., et al., *Multiple squamous cell carcinomas of the oral cavity in a young patient with graft-versus-host disease following allogenic bone marrow transplantation*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010.
64. Carrozzo, M., *Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases*. *Oral Dis*, 2008. **14**(3): p. 217-28.
65. Gonzalez-Moles, M.A., C. Scully, and J.A. Gil-Montoya, *Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation*. *Oral Dis*, 2008. **14**(3): p. 229-43.
66. Schifter, M., et al., *Oral mucosal diseases: the inflammatory dermatoses*. *Aust Dent J*, 2010. **55 Suppl 1**: p. 23-38.
67. Holmstrup, P., et al., *Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa*. *J Oral Pathol*, 1988. **17**(5): p. 219-25.

68. Gandolfo, S., et al., *Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population*. Oral Oncol, 2004. **40**(1): p. 77-83.
69. Rodstrom, P.O., et al., *Cancer and oral lichen planus in a Swedish population*. Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 131-8.
70. Porter, S.R., et al., *Development of squamous cell carcinoma in hepatitis C virus-associated lichen planus*. Oral Oncol, 1997. **33**(1): p. 58-9.
71. Carrozzo, M., et al., *An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection*. Oral Oncol, 1997. **33**(3): p. 220-5.
72. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
73. Mignogna, M.D., et al., *Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence ?* Oral Oncol, 2004. **40**(2): p. 120-30.
74. Carrozzo, M. and R. Thorpe, *Oral lichen planus: a review*. Minerva Stomatol, 2009. **58**(10): p. 519-37.
75. Montebugnoli, L., et al., *High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2006. **35**(12): p. 1140-4.
76. Eisen, D., *The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients*. J Am Acad Dermatol, 2002. **46**(2): p. 207-14.
77. Scully, C. and S.R. Porter, *The clinical spectrum of desquamative gingivitis*. Semin Cutan Med Surg, 1997. **16**(4): p. 308-13.
78. Helander, S.D. and R.S. Rogers, 3rd, *The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes*. J Am Acad Dermatol, 1994. **30**(1): p. 65-75.
79. De Jong, W.F., et al., *Epithelial dysplasia in oral lichen planus. A preliminary report of a Dutch-Hungarian study of 100 cases*. Int J Oral Surg, 1984. **13**(3): p. 221-5.
80. King, O.H., Jr., *Cytology--its value in the diagnosis of oral cancer*. Dent Clin North Am, 1971. **15**(4): p. 817-26.
81. Brocklehurst, P., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **11**: p. CD004150.

82. Boyle, J.O., et al., *The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer*. Cancer Res, 1993. **53**(19): p. 4477-80.
83. Kropveld, A., et al., *Discordance of p53 status in matched primary tumours and metastases in head and neck squamous cell carcinoma patients*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1996. **32B**(6): p. 388-93.
84. Kaur, J., A. Srivastava, and R. Ralhan, *Overexpression of p53 protein in betel- and tobacco-related human oral dysplasia and squamous-cell carcinoma in India*. Int J Cancer, 1994. **58**(3): p. 340-5.
85. Regezi, J.A., et al., *p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas*. J Oral Pathol Med, 1995. **24**(1): p. 18-22.
86. Montebugnoli, L., et al., *Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated to Ki67 Antigen in Oral Carcinogenesis*. Open Dent J, 2008. **2**: p. 24-9.
87. Shin, D.M., et al., *Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 321-6.
88. el-Naggar, A.K., et al., *Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma*. Cancer Res, 1995. **55**(12): p. 2656-9.
89. Nawroz, H., et al., *Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1152-5.
90. van der Riet, P., et al., *Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1156-8.
91. Ai, L., et al., *The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases*. Mod Pathol, 2003. **16**(9): p. 944-50.
92. Rocco, J.W. and D. Sidransky, *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 42-55.
93. Yuen, P.W., et al., *Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas*. J Clin Pathol, 2002. **55**(1): p. 58-60.
94. Gologan, O., E.L. Barnes, and J.L. Hunt, *Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(6): p. 792-6.

95. Karsai, S., et al., *Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis*. J Pathol, 2007. **211**(3): p. 314-22.
96. Muirhead, D.M., H.T. Hoffman, and R.A. Robinson, *Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma*. J Clin Pathol, 2006. **59**(7): p. 711-5.
97. Nemes, J.A., et al., *Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **102**(3): p. 344-52.
98. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
99. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
100. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity*. Anal Biochem, 1983. **132**(1): p. 6-13.
101. Worm, J. and P. Guldborg, *DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy*. J Oral Pathol Med, 2002. **31**(8): p. 443-9.
102. Shaw, R., *The epigenetics of oral cancer*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2006. **35**(2): p. 101-8.
103. Gasche, J.A. and A. Goel, *Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis*. Future Oncol, 2012. **8**(11): p. 1407-25.
104. Jithesh, P.V., et al., *The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2013. **108**(2): p. 370-9.
105. Mascolo, M., et al., *Epigenetic dysregulation in oral cancer*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(2): p. 2331-53.
106. Towle, R., et al., *Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer*. Oral Oncol, 2013. **49**(11): p. 1033-42.
107. Diez-Perez, R., et al., *Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review)*. Oncol Rep, 2011. **25**(5): p. 1203-9.
108. Bediaga, N., et al., *Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease*. Oral Dis, 2014. **20**(8): p. 821-6.
109. Demokan, S., et al., *KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses*. Int J Cancer, 2010. **127**(10): p. 2351-9.

110. Langevin, S.M., et al., *MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(5): p. 864-70.
111. Nagata, S., et al., *Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma*. *Cancer*, 2012. **118**(17): p. 4298-308.
112. Pattani, K.M., et al., *Endothelin receptor type B gene promoter hypermethylation in salivary rinses is independently associated with risk of oral cavity cancer and premalignancy*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010. **3**(9): p. 1093-103.
113. Schussel, J., et al., *EDNRB and DCC salivary rinse hypermethylation has a similar performance as expert clinical examination in discrimination of oral cancer/dysplasia versus benign lesions*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(12): p. 3268-75.
114. Cao, J., et al., *Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(16): p. 5178-83.
115. Dang, J., et al., *MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2013. **42**(4): p. 315-21.
116. Hasegawa, M., et al., *Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck*. *Oncogene*, 2002. **21**(27): p. 4231-6.
117. Kato, K., et al., *Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. **132**(11): p. 735-43.
118. Khor, G.H., et al., *DNA methylation profiling revealed promoter hypermethylation-induced silencing of p16, DDAH2 and DUSP1 in primary oral squamous cell carcinoma*. *Int J Med Sci*, 2013. **10**(12): p. 1727-39.
119. Kordi-Tamandani, D.M., et al., *Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer*. *Arch Oral Biol*, 2010. **55**(10): p. 809-14.
120. Marsit, C.J., et al., *Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(3): p. 416-22.
121. Rosas, S.L., et al., *Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients*. *Cancer Res*, 2001. **61**(3): p. 939-42.

122. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients*. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 892-5.
123. Su, P.F., et al., *p16(INK4A) promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner*. *Oral Oncol*, 2010. **46**(10): p. 734-9.
124. Viet, C.T., R.C. Jordan, and B.L. Schmidt, *DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer*. *J Calif Dent Assoc*, 2007. **35**(12): p. 844-9.
125. Ismail, S.B., S.K. Kumar, and R.B. Zain, *Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation*. *J Oral Sci*, 2007. **49**(2): p. 89-106.
126. Amin, S., A. Parker, and J. Mann, *ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(9): p. 1654-8.
127. Claus, R., et al., *Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2014. **124**(1): p. 42-8.
128. Claus, R., et al., *Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(20): p. 2483-91.
129. Savoia, A., et al., *Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations*. *Haematologica*, 2011. **96**(3): p. 417-23.
130. Okada, Y., et al., *The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 769-80.
131. Ando, T., et al., *DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2367-74.
132. Bandres, E., et al., *Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(11): p. 2737-43.
133. Kozaki, K., et al., *Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2094-105.
134. Montebugnoli, L., et al., *Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow-up*. *Histopathology*, 2010. **57**(4): p. 528-34.

135. Angiero, F., et al., *Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(5A): p. 2535-9.
136. Cunningham, L.L., Jr., et al., *Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. **102**(1): p. 77-81.
137. Bradley, K.T., S.D. Budnick, and S. Logani, *Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(10): p. 1310-6.
138. Hafkamp, H.C., et al., *A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(3): p. 394-400.
139. Natarajan, E., et al., *Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(2): p. 477-91.
140. Montebugnoli, L., et al., *Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein in oral lichen planus*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011. **112**(2): p. 222-7.
141. Poomsawat, S., et al., *Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy*. *J Oral Pathol Med*, 2011. **40**(4): p. 294-9.
142. Campisi, G., et al., *HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004. **98**(6): p. 705-11.
143. Cianfriglia, F., et al., *Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006. **25**(1): p. 21-8.
144. Jontell, M., et al., *Human papilloma virus in erosive oral lichen planus*. *J Oral Pathol Med*, 1990. **19**(6): p. 273-7.
145. Mattila, R., J. Rautava, and S. Syrjanen, *Human papillomavirus in oral atrophic lichen planus lesions*. *Oral Oncol*, 2012. **48**(10): p. 980-4.
146. Sand, L., et al., *Human papilloma viruses in oral lesions*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(2B): p. 1183-8.
147. Szarka, K., et al., *Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential*. *Oral Microbiol Immunol*, 2009. **24**(4): p. 314-8.

148. Vesper, M., et al., [*Detection of human papillomavirus (HVP)-DNA in oral manifestation of lichen planus*]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1997. **1**(3): p. 146-9.
149. Accurso, B.T., et al., *Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011. **112**(3): p. 359-66.
150. Buajeeb, W., et al., *Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions*. *J Oral Pathol Med*, 2009. **38**(1): p. 104-8.
151. de Roda Husman, A.M., et al., *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. *J Gen Virol*, 1995. **76 (Pt 4)**: p. 1057-62.
152. Tieben, L.M., et al., *Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers*. *J Virol Methods*, 1993. **42**(2-3): p. 265-79.
153. Moberg, M., I. Gustavsson, and U. Gyllensten, *Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(7): p. 3221-8.
154. Ha, P.K., et al., *Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(5): p. 1203-9.
155. Fregonesi, P.A., et al., *p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus*. *J Histochem Cytochem*, 2003. **51**(10): p. 1291-7.
156. Pannone, G., et al., *Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization*. *Infect Agent Cancer*, 2012. **7**: p. 4.
157. Eisenberg, E., *Oral lichen planus: a benign lesion*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000. **58**(11): p. 1278-85.
158. Zhang, L., et al., *Molecular analysis of oral lichen planus. A premalignant lesion?* *Am J Pathol*, 1997. **151**(2): p. 323-7.
159. Sklavounou-Andrikopoulou, A., et al., *Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF-alpha, Fas/Apo-1 and Bcl-2 in oral lichen planus*. *J Oral Pathol Med*, 2004. **33**(7): p. 386-90.

160. Zhou, G., et al., *Activation of nuclear factor-kappa B correlates with tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus: a clinicopathologic study in atrophic-erosive and reticular form.* J Oral Pathol Med, 2009. **38**(7): p. 559-64.
161. Khan, A., et al., *Th1 cytokines in oral lichen planus.* J Oral Pathol Med, 2003. **32**(2): p. 77-83.
162. Ito, K., et al., *Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells.* Nat Med, 2006. **12**(4): p. 446-51.
163. Harvat, B.L. and A.M. Jetten, *Decreased growth inhibitory responses of squamous carcinoma cells to interferon-gamma involve failure to recruit cki proteins into cdk2 complexes.* J Invest Dermatol, 2001. **117**(5): p. 1274-81.
164. Saunders, N.A. and A.M. Jetten, *Control of growth regulatory and differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes by interferon gamma. Antagonism by retinoic acid and transforming growth factor beta 1.* J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2016-22.
165. Silber, J., et al., *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells.* BMC Med, 2008. **6**: p. 14.
166. Braakhuis, B.J., et al., *Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions.* Head Neck, 2002. **24**(2): p. 198-206.
167. van Oijen, M.G., et al., *The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract.* Cancer, 2000. **88**(4): p. 884-93.
168. Leemans, C.R., et al., *Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor.* Cancer, 1994. **73**(1): p. 187-90.
169. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin.* Cancer, 1953. **6**(5): p. 963-8.
170. Warren S, G.O., *Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study.* . Am J Cancer 1932. **16**: p. 358–1414.
171. Hong, W.K., et al., *Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck.* N Engl J Med, 1990. **323**(12): p. 795-801.

172. Scholes, A.G., et al., *Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin?* Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 2003-6.
173. Tabor, M.P., et al., *Discordance of genetic alterations between primary head and neck tumors and corresponding metastases associated with mutational status of the TP53 gene.* Genes Chromosomes Cancer, 2002. **33**(2): p. 168-77.
174. Leong, P.P., et al., *Distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(13): p. 972-7.
175. Sarode, S.C., G.S. Sarode, and A. Patil, *Criteria to define true second primary oral squamous cell carcinoma.* Oral Oncol, 2010. **46**(11): p. 834.
176. Ha, P.K. and J.A. Califano, *The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck.* Crit Rev Oral Biol Med, 2003. **14**(5): p. 363-9.
177. Lydiatt, W.M., et al., *Molecular support for field cancerization in the head and neck.* Cancer, 1998. **82**(7): p. 1376-80.
178. Pateromichelakis, S., et al., *Molecular analysis of paired tumours: time to start treating the field.* Oral Oncol, 2005. **41**(9): p. 916-26.
179. Vekony, H., et al., *Salivary gland carcinosarcoma: oligonucleotide array CGH reveals similar genomic profiles in epithelial and mesenchymal components.* Oral Oncol, 2009. **45**(3): p. 259-65.
180. Diaz-Cano, S.J., A. Blanes, and H.J. Wolfe, *PCR techniques for clonality assays.* Diagn Mol Pathol, 2001. **10**(1): p. 24-33.
181. Mroz, E.A., et al., *High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma.* Cancer, 2013. **119**(16): p. 3034-42.
182. Zhang, X.C., et al., *Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an oropharyngeal squamous cell carcinoma revealed by whole-genome sequencing.* Neoplasia, 2013. **15**(12): p. 1371-8.
183. Arduino, P.G., et al., *Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases.* J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(8): p. 1570-9.
184. Melchers, L.J., et al., *Tumour infiltration depth ≥ 4 mm is an indication for an elective neck dissection in pT1cN0 oral squamous cell carcinoma.* Oral Oncol, 2012. **48**(4): p. 337-42.

185. Okada, Y., et al., *An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis.* Int J Oral Maxillofac Surg, 2003. **32**(3): p. 284-8.
186. Poeschl, P.W., et al., *Staging and grading as prognostic factors in maxillary squamous cell carcinoma.* J Oral Maxillofac Surg, 2011. **69**(12): p. 3038-44.
187. Braakhuis, B.J., et al., *Molecular analysis of surgical margins in head and neck cancer: more than a marginal issue.* Oral Oncol, 2010. **46**(7): p. 485-91.
188. Gonzalez-Garcia, R., et al., *Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients.* Head Neck, 2009. **31**(9): p. 1168-80.
189. Rosai J. Standardized surgical pathology reporting for major tumor types, O.c.a.o.c., in Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th ed. Elsevier Publisher, Edinburgh, 2011.
190. Gale N, P.B., Sidransky D, et al. 2005 . *Epithelia precursor lesions.* In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranski D, et al., editors. Pathology and genetics Head and Neck tumours. Lyon: World Health Classification of Tumours;, 2005: p. 177–179.
191. Rosin, M.P., et al., *Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 357-62.
192. Partridge, M., et al., *Profiling clonality and progression in multiple premalignant and malignant oral lesions identifies a subgroup of cases with a distinct presentation of squamous cell carcinoma.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(7): p. 1860-6.
193. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications.* Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1727-30.
194. Loree, T.R. and E.W. Strong, *Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma.* Am J Surg, 1990. **160**(4): p. 410-4.
195. Upile, T., et al., *The uncertainty of the surgical margin in the treatment of head and neck cancer.* Oral Oncol, 2007. **43**(4): p. 321-6.
196. Binahmed, A., R.W. Nason, and A.A. Abdoh, *The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer.* Oral Oncol, 2007. **43**(8): p. 780-4.
197. Yuen, P.W., et al., *Clinicopathological analysis of local spread of carcinoma of the tongue.* Am J Surg, 1998. **175**(3): p. 242-4.

198. Wong, L.S., et al., *Influence of close resection margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal carcinoma*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2012. **50**(2): p. 102-8.
199. Chandu, A., G. Adams, and A.C. Smith, *Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2005. **34**(5): p. 514-20.
200. Nason, R.W., et al., *What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer?* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **107**(5): p. 625-9.
201. Vikram, B., et al., *Failure at the primary site following multimodality treatment in advanced head and neck cancer*. Head Neck Surg, 1984. **6**(3): p. 720-3.
202. Meier, J.D., D.A. Oliver, and M.A. Varvares, *Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey*. Head Neck, 2005. **27**(11): p. 952-8.
203. Sutton, D.N., et al., *The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2003. **32**(1): p. 30-4.
204. Kropveld, A., et al., *Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers*. Lab Invest, 1999. **79**(3): p. 347-53.
205. Aulmann, S., et al., *Clonality of lobular carcinoma in situ (LCIS) and metachronous invasive breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 331-5.
206. Morandi, L., et al., *Genetic similarities and differences between lobular in situ neoplasia (LN) and invasive lobular carcinoma of the breast*. Virchows Arch, 2006. **449**(1): p. 14-23.
207. Morandi, L., et al., *Intraepidermal cells of Paget's carcinoma of the breast can be genetically different from those of the underlying carcinoma*. Hum Pathol, 2003. **34**(12): p. 1321-30.
208. Nomoto, S., et al., *Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(2): p. 481-7.
209. Gutierrez-Gonzalez, L., et al., *The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach*. Gastroenterology, 2011. **140**(4): p. 1251-1260 e1-6.
210. Foschini, M.P., et al., *Cancerization of cutaneous flap reconstruction for oral squamous cell carcinoma: report of three cases studied with the mtDNA D-loop sequence analysis*. Histopathology, 2011. **58**(3): p. 361-7.

211. de Bree, R., et al., *Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer*. Laryngoscope, 2000. **110**(3 Pt 1): p. 397-401.
212. Slootweg, P.J., G.J. Hordijk, and R. Koole, *Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell cancer and their therapeutic relevance*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1996. **32B**(6): p. 413-5.
213. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
214. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(4): p. 406-25.
215. Kumar, S. and S.R. Gadagkar, *Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies*. J Mol Evol, 2000. **51**(6): p. 544-53.
216. Kumar, S., et al., *MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software*. Bioinformatics, 2001. **17**(12): p. 1244-5.
217. Kimura, M., *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J Mol Evol, 1980. **16**(2): p. 111-20.
218. Efron B, T.R., *An introduction to the bootstrap*. New York: Chapman & Hall. 1993.
219. Spector, J.G., et al., *Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx*. Laryngoscope, 2001. **111**(6): p. 1079-87.
220. Tjebbes, G.W., et al., *p53 tumor suppressor gene as a clonal marker in head and neck squamous cell carcinoma: p53 mutations in primary tumor and matched lymph node metastases*. Oral Oncol, 1999. **35**(4): p. 384-9.
221. van der Sijp, J.R., et al., *Determination of the molecular relationship between multiple tumors within one patient is of clinical importance*. J Clin Oncol, 2002. **20**(4): p. 1105-14.

INDICE DELLEFIGURE

Figura 1: stabilità delle curve di mortalità per carcinoma oro-faringeo ogni 100.000 individui di sesso femminile nel periodo 1951-2001. Fonte OMS-AIRC.

Figura 2: stabilità delle curve di mortalità per carcinoma oro-faringeo ogni 100.000 individui di sesso maschile nel periodo 1951-2001. Fonte OMS-AIRC.

Figura 3: citologico ottenuto da paziente affetto da LPO e facente parte della popolazione di studio. Il citologico mostra come mediante brushing vengono prelevate quasi esclusivamente cheratinociti dello strato superficiale e medio.

Figura 4: citologico ottenuto da paziente affetto da HG SIL e facente parte della popolazione di studio. Anche in questo caso sono state prelevate quasi esclusivamente cheratinociti dello strato superficiale e medio.

Figura 5: Analisi di metilazione per il gene GP1BB nel caso DG (HG SIL).

Figura 6: analisi di metilazione per il gene GP1BB per la mucosa sana controlaterale del caso DG (HG SIL).

Figura 7: Analisi statistica mediante software QUMA per il gene GP1BB nel caso DG (HG SIL).

Figura 8: Analisi di metilazione per il gene ZAP70 nel caso DG (HG SIL).

Figura 9: analisi di metilazione per il gene ZAP70 in un donatore sano.

Figura 10: Analisi statistica mediante software QUMA per il gene ZAP70 nel caso DG (HG SIL).

Figura 11: Mutazioni di TP53 nel caso DG (HG SIL).

Figura 12: iperespressione immunoistochimica di p16^{INK4A} in un vetrino con diagnosi di LPO.

Figura 13: Ipotesi di meccanismo di field cancerization. FONTE "A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications Journal of Oral Pathology & Medicine Volume 33, Issue 6, pages 317-322, 16 JUN 200".

Figura 14: : Distinzione tra RL, SPT e SFT. FONTE "Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. Head & Neck Volume 24, Issue 2, pages 198-206, 4 JAN 2002".

Figura 15: Immagini istologica che descrive un margine chirurgico distante (>5 mm).

Figura 16: Immagine istologica che descrive un margine chirurgico vicino (>1 mm e <5 mm).

Figura 17: Immagine istologica che descrive la presenza di displasia sul margine.

Figura 18: Immagine istologica che descrive un margine chirurgico coinvolto (<1 mm).

Figura 19: Immagine istologica che descrive un caso di infiltrazione perineurale positiva.

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1: Elenco delle lesioni da includere nella diagnosi differenziale di leucoplachia del cavo orale.

Tabella 2: Stadi istopatologici dei precursori del CSO secondo la classificazione dell'OMS del 2005.

Tabella 3: Stadi istopatologici dei precursori del CSO secondo la classificazione di Ljubljana del 2009.

Tabella 4: Distinzione tra HG SIL e LG SIL secondo la nuova classificazione di Ljubljana del 2014.

Tabella 5: Caratteristiche cliniche della popolazione di studio selezionata per l'analisi di metilazione mediante metodica brushing.

Tabella 6: Primer utilizzati per identificare le isole CpG in ognuno dei geni selezionati.

Tabella 7: concentrazioni medie di DNA ottenute durante prelievo brushing in relazione alle variabili analizzate (sede, clinica, patologia, strumento e operatore).

Tabella 8: Tabella riassuntiva dello stato di metilazione di ognuno dei 7 geni e delle mutazioni di TP53 nei pazienti affetti da CSO.

Tabella 9: Tabella riassuntiva dello stato di metilazione di ognuno dei 7 geni e delle mutazioni di TP53 nei pazienti affetti da HG SIL e LG SIL.

Tabella 10: Tabella riassuntiva dello stato di metilazione di ognuno dei 7 geni e delle mutazioni di TP53 nei pazienti affetti da LPO.

Tabella 11: Tabella riassuntiva per valutare la relazione tra metilazione dei geni GP1BB, ZAP70, KIF1A e miR137 e le mutazioni di TP53.

Tabella 12: elenco di primer utilizzati per identificare il più ampio spettro di genotipi appartenenti ad HPV.

Tabella 13: riassume le caratteristiche cliniche e istologiche della popolazione di studio del lavoro 3.

Tabella 14: riassume le caratteristiche cliniche e di trattamento della popolazione di studio del lavoro 4.

Tabella 15: riassume i risultati di TP53 e mtDNA nel lavoro 4.

INDICE DEI GRAFICI

Grafico 1: L'analisi statistica ANOVA a una via utilizzata nel lavoro 1 che mostra come il cyotbrush permetta di raccogliere una quantità di DNA statisticamente superiore rispetto al softbrush ($F:3,83$ $p<.05$).

Grafico 2: ANOVA a una via mostra nel lavoro 2 una assenza di relazione tra i valori di p16^{INK4A} e la positività per HPV ($F=.07$; ns).

Grafico 3: grafico che mostra come l'infiltrazione perineurale sia l'unica variabile statisticamente correlata con la comparsa di metastasi linfonodale (chi quadrato 4.7; $p=0.030$) nel lavoro 3.

Grafico 4: grafico che mostra come l'infiltrazione perineurale anche in questo caso si è dimostrato l'unica variabile significativamente correlata con la comparsa di RL (chi quadrato 5.7; $p=0.017$) nel lavoro 3.

Grafico 5: grafico che mostra come lo stato del margine chirurgico è stata individuato come l'unica variabile significativamente correlata con la comparsa di STP (chi quadrato 13.6; $p=0.003$) nel lavoro 3.

PUBBLICAZIONI

I risultati della presente tesi sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni e comunicazioni orali a congressi.

Pubblicazioni in extenso

- Morandi L, **Gissi DB***(contributed equally to the work), Tarsitano A, Asioli S, Monti V, del Corso G, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. DNA Methylation analysis by bisulfite next generation sequencing to early detect Oral Squamous Cell Carcinoma and High Grade Squamous Intraepithelial Lesion from oral brushings. Submitted to Int J of Cancer
- Morandi L, Tarsitano A*(contributed equally to the work), **Gissi DB**, Leonardi E, Balbi T, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. Clonality analysis in primary oral squamous cell carcinoma and related lymph-node metastasis revealed by TP53 and mtDNA next generation sequencing analysis. Craniomaxillofac Surg. 2015 Mar;43(2):208-13.
- Montebugnoli L, **Gissi DB**, Scapoli L, Palmieri A, Morandi L, Manelli I, Foschini MP. p16INK4 Expression is not Associated with Human Papilloma Virus in Oral Lichen Planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014 Dec;118(6):694-702.
- Montebugnoli L, **Gissi DB**, Flamminio F, Gentile L, Dallera V, Leonardi E, Beccarini T, Foschini MP. Clinicopathologic parameters related to recurrence and locoregional metastasis in 180 oral squamous cell carcinomas. Int J Surg Pathol. 2014 Feb;22(1):55-62. Epub 2013 Dec 10.
- Montebugnoli L, Leonardi E, Morandi L, Farnedi A, **Gissi DB**, Marchetti C, Tarsitano A, Balbi T, Gentile L, Cocchi R, Foschini MP. Genetic relationship between multiple squamous cell carcinomas arising in the oral cavity. Head Neck. 2013 Apr 30.

Comunicazioni a congressi: sessione comunicazioni orali (O) e sessione poster (P)

- **Gissi DB**, Morandi L, Tarsitano A, Foschini MP, Montebugnoli L DNA methylation analysis by bisulfite next generation sequencing to early detect potentially malignant oral lesions from oral brushing. Simposio SIPMO Torino 17-18 Ottobre 2014. Pubblicato su "Annali di Stomatologia" (O). Premio come miglior comunicazione orale.
- Gabusi A, **Gissi DB**, Sozzi L, Foschini MP, Morandi L. Mitochondrial DNA clonality assay and P53 mutations in oral squamous cell carcinoma and matched neck metastases. Simposio SIPMO Torino 17-18 Ottobre 2014. Pubblicato su "Annali di Stomatologia" (P).

- Sozzi L, Gabusi A, Morandi L, Monti V, **Gissi DB**. Assessment of a non invasive genetic procedure to early detect potentially malignant oral lesions. Simposio SIPMO Torino 17-18 Ottobre 2014. Pubblicato su “Annali di Stomatologia” (P)
- **Gissi DB**. Mitochondrial DNA clonality assay in oral squamous cell carcinoma. “XII Congresso Nazionale e Il Congresso Internazionale SIPMO: infection, inflammation and carcinogenesis. Evolving concepts in oral diseases. Roma 10-12 Ottobre 2013. (O). Menzione di merito nella sezione comunicazione orale
- Pinto S, **Gissi DB**, Morandi L, Scapoli L, Foschini MP, Montebugnoli L. p16ink4 expression is not associated with the presence of human papilloma virus in oral lichen planus (Atti XX congresso Nazionale di Odontoiatria Roma 2013) (P)
- Manzali C, Flamminio F, Leonardi E, **Gissi DB**, Foschini MP, Montebugnoli L. Clinico-pathologic parameters related to recurrence and loco-regional metastasis in 180 oral squamous cell carcinoma from Italian patients. (Atti XX congresso Nazionale di Odontoiatria Roma 2013) (P)
- Flamminio F, Peluso S, Farnedi A, Leonardi E, Gentile L, **Gissi DB**, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. Risk of neoplastic transformation in oral epithelial precursor lesions. Virchow archive. Volume 461, Supplement 1 September 2012. Atti 24th European Congress of Pathology Prague 2012 (P)
- Flamminio F, Beccarini T, Gentile L, Leonardi E, Farnedi A, **Gissi DB**, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. The prognostic value of resection margins in oral squamous cell carcinoma. Virchow archive. Volume 461, Supplement 1 September 2012. Atti 24th European Congress of Pathology Prague 2012 (P)
- Tarsitano A, Montebugnoli L, Leonardi E, Morandi L, **Gissi DB**, Farnedi A, Cocchi R, Foschini MP, Marchetti. Genetic relationship between multiple squamous cell carcinomas arising in the oral cavity. 5th European Conference of Head & Neck Oncology April 2012, Poznan Poland (O)

Durante il periodo di dottorato sono state anche prodotte le seguenti pubblicazioni su temi riguardanti la patologia e l'oncologia del cavo orale.

Pubblicazioni in extenso

- **Gissi DB**, Gabusi A, Servidio D, Cervellati F, Montebugnoli L. Predictive role of p53 protein as a single marker or associated with ki67 antigen in oral leukoplakia: a retrospective longitudinal study. *Open Dent J.* 2015 Jan 30;9:41-5.
- Piccinni C, **Gissi DB**, *(contributed equally to the work), Gabusi A, Montebugnoli L, Poluzzi E. Paraesthesia after Local Anaesthetics: An Analysis of Reports to the FDA Adverse Event Reporting System. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Nov 25.
- Del Corso G, Tardio ML, **Gissi DB**, Marchetti C, Montebugnoli L, Tarsitano A. Ki-67 and p53 expression in ghost cell odontogenic carcinoma: a case report and literature review. *Oral Maxillofac Surg.* 2014 Sep 14.
- Montebugnoli L, Gabusi A, **Gissi DB**, Cervellati F, Servidio D. Between-lesion discrepancies in terms of dysplasia, cell turnover and diagnosis in patients with multiple potentially malignant oral lesions. *Open Dent J.* 2013 Nov 29;7:169-74.
- **Gissi DB**, Bernardi A, D'Andrea M, Montebugnoli L. Paraneoplastic pemphigus presenting with a single oral lesion. *BMJ Case Rep.* 2013 Jan 2;2013.
- Montebugnoli L, Venturi M, **Gissi DB**, Cervellati F. Clinical and histologic healing of lichenoid oral lesions following amalgam removal: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Jun;113(6):766-72.

Comunicazioni a congressi: sessione comunicazioni orali (O) e sessione poster (P)

- Bernardi A, Gabusi A, Servidio D, Diano F, **Gissi DB**. Mitochondrial DNA analysis in a case of multiple oral carcinomas following allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 7 (P)*
- Diano F, Manzali C, Pinto S, Servidio D, **Gissi DB**. Loss of p53 protein in leukoplakias may reveal the presence of an oral squamous cell carcinoma. A case series analysis. *Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 15 (P)*
- Gabusi A, Pinto S, Servidio D, Grelli I, **Gissi DB**. A single biopsy with multiple pre-malignant lesions may lead to an inappropriate treatment: a report of two cases. *Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 18 (P)*

- Grelli I, Servidio D, **Gissi DB**, Pinto S, Gabusi A. An unusual case of everolimus-associated recurrent oral ulcerations. Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 22 (P)
- Pinto S, Gabusi A, Servidio D, Tiberio C, **Gissi DB**. A case of linear IgA disease limited to the oral mucosa. Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 36 (P)
- Tiberio C, Venturi M, Servidio D, Diano F, **Gissi DB**. A rare case of oral anthracosis resembling an oral leukoplakia. Suppl. to "Annali di Stomatologia" Vol. IV- No.2- April/June 2013- Quarterly pag. 44 (P)