



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Odontoiatria e Protesi Dentaria

Presidente: Prof. Andrea Santarelli

**RUOLO PROGNOSTICO DI MARCATORI
IMMUNOISTOCHIMICI E MORFOMETRICI NEL CARCINOMA
SQUAMOCELLULARE DELLA LINGUA**

**PROGNOSTIC ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL AND
MORPHOMETRIC MARKERS IN ORAL TONGUE SQUAMOUS
CELL CARCINOMA**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Marco Mascitti

Tesi di laurea di:

Giorgia Tomassetti

Correlatore:

Dott.ssa Lucrezia Togni

Anno accademico 2025/2026

*“Da qualche parte, qualcosa di incredibile aspetta di essere conosciuto”
- Carl Sagan*

INDICE

CAPITOLO 1. IL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DELLA LINGUA	1
1.1 DEFINIZIONE E CONSIDERAZIONI ANATOMICHE	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA	5
1.3 FATTORI DI RISCHIO	7
1.4 CONSIDERAZIONI CLINICHE	10
1.5 DIAGNOSI	12
1.6 STADIAZIONE	13
1.7 TRATTAMENTO	17
CAPITOLO 2. ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRANSFERASI (NNMT) E CATECOL-O-METILTRANSFERASI (COMT)	19
2.1 ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRANSFERASI (NNMT)	19
2.2 ENZIMA CATECOLO-O-METILTRANSFERASI (COMT)	27
CAPITOLO 3. SCOPO DEL LAVORO	34
CAPITOLO 4. MATERIALI E METODI	35
4.1 SELEZIONE DEI CASI CLINICI	35
4.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA	36
4.3 VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA	42
4.4 ANALISI STATISTICHE	43
CAPITOLO 5. RISULTATI	44
5.1 CARATTERISTICHE CLINICHE E PATOLOGICHE	44
5.2 ANALISI DI CORRELAZIONE	45
5.3 ANALISI ISTOPATOLOGICA DEI BIOMARCATORI	49
CAPITOLO 6. DISCUSSIONE	54
BIBLIOGRAFIA	59

CAPITOLO 1. IL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DELLA LINGUA

1.1 Definizione e considerazioni anatomiche

Il carcinoma squamocellulare della lingua (OTSCC), sottotipo più frequente fra i carcinomi del cavo orale, origina dal suo epitelio di rivestimento e, essendo una neoplasia maligna, presenta una forte tendenza a diffondersi precocemente ai tessuti circostanti nonché ai linfonodi loco-regionali e alla rete perineurale impattando fortemente sullo stato di salute e sulla funzione dell'apparato stomatognatico.

Le sedi della lingua maggiormente colpite sono il terzo medio, seguito da ventre, dorso ed apice.

La lingua è un organo impari e mediano, costituito prevalentemente da muscolatura striata e rivestito da una tonaca mucosa formata da un epitelio pavimentoso stratificato che poggia su una lamina propria connettivale densa.

La tonaca mucosa della lingua mostra caratteristiche istologiche variabili in relazione alla sede. In particolare, la superficie dorsale è rivestita da mucosa specializzata caratterizzata dalla presenza delle papille linguali e gustative, al contrario la superficie ventrale è rivestita da una mucosa di rivestimento non cheratinizzata, scarsamente aderente ai piani sottostanti.

Dal punto di vista anatomico, la lingua si distingue in un corpo e in una radice, attraverso la quale l'organo prende inserzione su diversi punti di ancoraggio ossei.

Nel corpo linguale è possibile distinguere una porzione anteriore (2/3 anteriori), comunemente definita "lingua mobile o porzione orale della lingua (OT)", e una porzione posteriore (1/3 posteriore), nota come "base della lingua" che fa parte funzionalmente dell'orofaringe (Standring, 2016).

Dal punto di vista strutturale, la lingua presenta uno scheletro fibroso interno costituito dalla membrana ioglossa e dal setto linguale, sul quale si inseriscono i muscoli linguali (Ansarin et al., 2019). Questi ultimi sono distinti in:

- muscoli estrinseci (genioglossi, ioglossi, condroglossi, stiloglossi, palatoglossi, faringoglossi e amigdaloglossi): originano al di fuori della lingua;
- muscoli intrinseci (longitudinale superiore, longitudinale inferiore, trasverso e verticale): originano e si inseriscono interamente all'interno dell'organo consentendo i movimenti fini e complessi (Calabrese et al., 2020).

All'interno della lingua, in corrispondenza dell'OT, sono inoltre presenti strutture ghiandolari tubulo-acinose ramificate, che nel loro insieme costituiscono le ghiandole linguali ovvero le ghiandole anteriori, laterali, posteriori profonde e posteriori superficiali della base (Bassler, 1987) .

Per quanto riguarda la vascolarizzazione, questa dipende maggiormente dall'arteria linguale, ramo della carotide esterna e in minor misura dalle arterie palatina ascendente e faringea ascendente.

Il drenaggio venoso avviene tramite le vene sottolinguali, linguali profonde e dorsale, che confluiscono a livello della vena linguale (Standring, 2016).

Il drenaggio linfatico prevede vasi linfatici differenti in base alle regioni della lingua stessa: l'apice è drenato dai linfonodi sottomentali, la porzione centrale dell'OT è drenata da un gruppo di collettori afferenti ai linfonodi sottomandibolari ed i margini laterali dell'OT sono drenati dai linfonodi sottomandibolari omolaterali (Gvetadze et al., 2020).

Ricordiamo inoltre che, i linfonodi della regione testa-collo sono suddivisi in livelli (Figura 1) :

- Linfonodi sottomentali (sottolivello IA): sono i linfonodi che si trovano nella regione delimitata dal ventre anteriore dei muscoli digastrici e dall'osso ioide;
- Linfonodi sottomandibolari (sottolivello IB): sono i linfonodi che si trovano nella regione delimitata dal ventre anteriore del muscolo digastrico, dal muscolo stiloioideo e dal corpo della mandibola;
- Linfonodi giugulari superiori (sottolivelli IIA e IIB): sono i linfonodi localizzati intorno al terzo superiore della vena giugulare interna e in prossimità del nervo accessorio spinale, estendendosi dalla base del cranio (superiormente) al margine inferiore dell'osso ioide

(inferiormente). Il limite anteriore (mediale) è rappresentato dal muscolo stiloideo, mentre il limite posteriore (laterale) è il margine posteriore del muscolo sternocleidomastoideo. I due livelli sono separati dal nervo accessorio spinale;

- Linfonodi giugulari medi (livello III): sono i linfonodi situati attorno al terzo medio della vena giugulare interna, estendendosi dal margine inferiore dell'osso ioide (superiormente) al bordo inferiore della cartilagine cricoidea (inferiormente). Il limite anteriore (mediale) è rappresentato dal margine laterale del muscolo sternoioideo, mentre il limite posteriore (laterale) è costituito dal margine posteriore del muscolo sternocleidomastoideo.
- Linfonodi giugulari inferiori (livello IV): sono i linfonodi localizzati attorno al terzo inferiore della vena giugulare interna, estendendosi dal margine inferiore della cartilagine cricoidea (superiormente) alla clavicola (inferiormente). Il limite anteriore (mediale) è rappresentato dal margine laterale del muscolo sternoioideo, mentre il limite posteriore (laterale) è costituito dal margine posteriore del muscolo sternocleidomastoideo.
- Gruppo del triangolo posteriore (sottolivelli VA e VB): sono i linfonodi compresi in una regione delimitata dai muscoli sternocleidomastoideo e trapezio (superiormente), e dalla clavicola (inferiormente). Il limite anteriore (mediale) è il margine posteriore del muscolo sternocleidomastoideo mentre limite posteriore (laterale) è il margine anteriore del muscolo trapezio.

Il sottolivello VA comprende i linfonodi accessori spinali, mentre il sottolivello VB include i linfonodi che seguono i vasi cervicali trasversi e i linfonodi sopraclaveari, con l'eccezione del linfonodo di Virchow, che è localizzato nel livello IV.

- Gruppo del compartimento anteriore (livello VI): sono i linfonodi compresi tra l'osso ioide (superiormente) e l'incisura soprasternale (inferiormente). I limiti laterali sono rappresentati dalle arterie carotidi comuni.

- Sono i linfonodi pretracheali, paratracheali, precricoidoidei e i peritiroidei, inclusi quelli attorno al decorso del nervo laringeo ricorrente;
- Gruppo mediastinico superiore (livello VII): sono i linfonodi pretracheali, paratracheali ed esofagei (Robbins et al., 2002; Edge & American Joint Committee on Cancer., 2010).

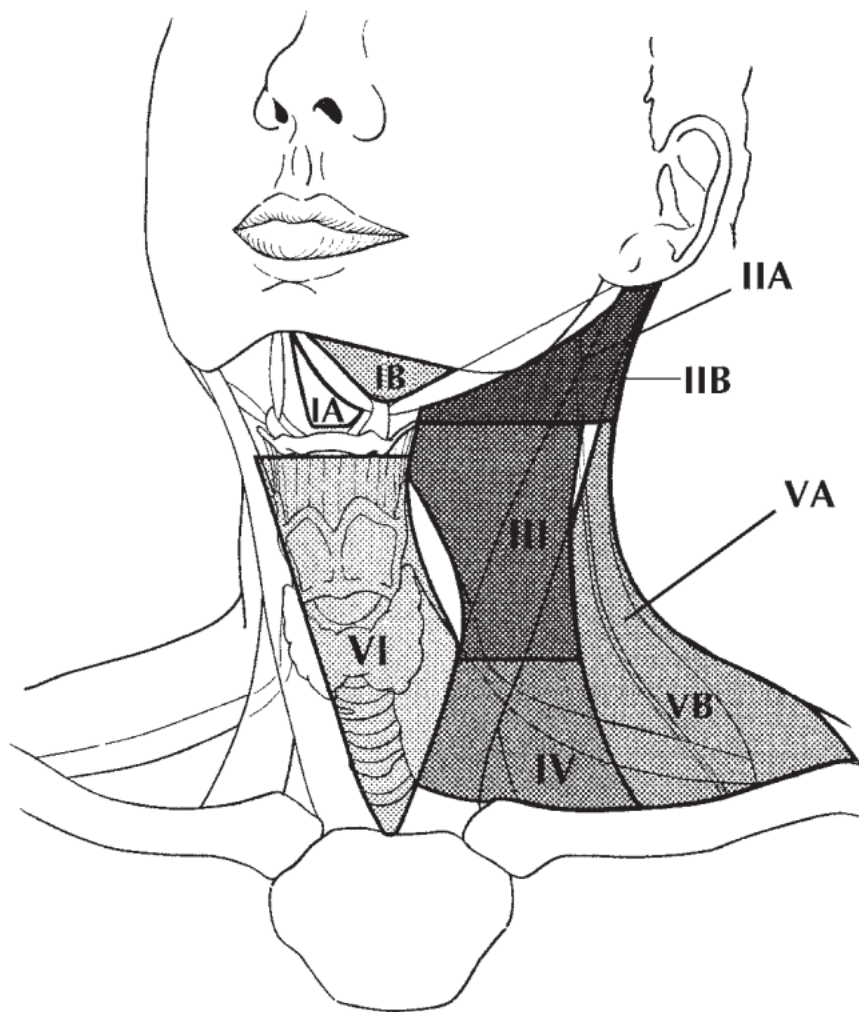


Figura 1: rappresentazione schematica dei livelli linfonodali del collo.

1.2 *Epidemiologia*

L'OTSCC rappresenta la neoplasia maligna più comune del cavo orale ed è una delle più frequenti tra le neoplasie del testa-collo, costituendo circa l'1% di tutti i tumori diagnosticati (Howlader et al., 2019).

I dati epidemiologici mostrano come l'incidenza di OTSCC tenda ad essere variabile tra i diversi Paesi: dagli 1,1 casi per 100.000 all'anno nel Regno Unito, ai 9,4 casi per 100.000 all'anno in India (Cancer incidence in five continents, 1987; Ng et al., 2017).

Per quanto riguarda l'andamento, si è registrato un graduale aumento dell'incidenza dell'OTSCC nelle ultime 4 decadi, soprattutto a partire dagli anni '90.

Dal punto di vista epidemiologico, l'OTSCC si riscontra prevalentemente negli individui di sesso maschile, con un picco di incidenza compreso tra la VI e l'VIII decade di vita, mentre risulta estremamente raro nei soggetti di età inferiore ai 20 anni (Dhanuthai et al., 2020). In linea con l'andamento generale del carcinoma orale, l'incidenza dell'OTSCC è più elevata negli uomini rispetto alle donne, circostanza attribuibile a una maggiore esposizione ai principali fattori di rischio, quali il consumo di alcol e il fumo di sigaretta. Tuttavia, in alcuni Paesi si sta osservando un incremento dell'incidenza anche nel sesso femminile, suggerendo il possibile coinvolgimento di ulteriori condizioni eziopatogenetiche oltre ai fattori di rischio tradizionali (Nemes et al., 2008). Numerosi studi hanno evidenziato un progressivo aumento dell'incidenza dell'OTSCC nel corso degli ultimi 40 anni, con un'accelerazione particolarmente marcata a partire dagli anni '90 (Satgunaseelan et al., 2020). Negli Stati Uniti, ad esempio, l'incidenza dell'OTSCC è aumentata di circa l'1% annuo tra il 1973 e il 2010. I dati del database "Surveillance, Epidemiology, and End Results" (SEER) mostrano come tale incremento interessi maggiormente il sesso maschile (1,2%) rispetto a quello femminile (0,5%), nonché i soggetti di età inferiore ai 45 anni (1,6%) rispetto a quelli più anziani (0,9%) (Ng et al., 2017). Questa tendenza rappresenta un elemento distintivo dell'OTSCC

rispetto alle altre neoplasie del cavo orale, che mostrano invece una stabilizzazione o addirittura una riduzione dell'incidenza nel tempo (Ng et al., 2017; Lenze et al., 2020).

Già all'inizio degli anni '90 erano emersi i primi segnali di un aumento dell'incidenza del carcinoma orale, in particolare dell'OTSCC, che rappresentava circa l'80% dei casi nei pazienti giovani. Tali osservazioni sono state successivamente confermate da numerosi studi condotti sia in Europa sia negli Stati Uniti, dai quali è emerso che, nei soggetti con età inferiore ai 45 anni, l'incremento annuo dell'incidenza dell'OTSCC varia attualmente dallo 0,4% al 3,3%, a seconda del Paese considerato (Hussein et al., 2017; Yosef et al., 2020; Paderno et al., 2018).

Questa tendenza appare ormai consolidata a livello globale e coinvolge anche Paesi extraeuropei. Studi multicentrici hanno infatti confermato che la lingua rappresenta la sede del cavo orale più frequentemente colpita da neoplasie maligne, in particolare dall'OTSCC, soprattutto nei soggetti con meno di 40 anni. Le coorti di pazienti giovani analizzate mostrano inoltre una maggiore rappresentanza femminile e una minore esposizione ai fattori di rischio tradizionali quali fumo e alcol. A titolo esemplificativo, in Australia l'incidenza dell'OTSCC nelle giovani donne è aumentata del 385% nel corso delle ultime tre decadi (Satgunaseelan et al., 2020).

Alla luce di tali evidenze, il costante incremento dei casi di OTSCC nei soggetti giovani, in particolare sotto i 40 anni, appare un dato critico e motivo di crescente preoccupazione. È opportuno sottolineare che i dati relativi alla prevalenza dell'OTSCC mostrano ampie variazioni tra le diverse macroaree geografiche, verosimilmente riconducibili a fattori sociosanitari ed economici, nonché a differenze metodologiche nei sistemi di raccolta e campionamento dei dati epidemiologici (Dhanuthai et al., 2020).

Un recente studio ha inoltre evidenziato come l'ambiente non influisca direttamente sul rischio di insorgenza dell'OTSCC, mentre la variabilità etnica, sebbene ancora da approfondire, sembra avere un ruolo rilevante: in particolare, è stato dimostrato che l'incidenza dell'OTSCC aumenta in modo più rapido e consistente nelle giovani donne di etnia caucasica (Joseph et al., 2015).

Per quanto riguarda la mortalità, gli studi non evidenziano differenze sostanziali tra i dati relativi

all'OTSCC e quelli riferiti al carcinoma orale nel suo complesso. Analizzando l'andamento della mortalità per OTSCC nel sesso maschile, si osserva un incremento a partire dagli anni '50, seguito da un picco verso la fine degli anni '80 e da una successiva riduzione all'inizio degli anni 2000. Nei soggetti di sesso femminile, invece, i tassi di mortalità risultano complessivamente più bassi, ma mostrano un lieve incremento nei Paesi industrializzati (La Vecchia et al., 2004).

1.3 Fattori di rischio

Secondo studi più recenti, i fattori di rischio per il carcinoma orale non vengono stratificati in base alla sede specifica ma si riferiscono complessivamente al carcinoma orale.

Sicuramente la correlazione più importante è quella fra fumo di tabacco e abuso di bevande alcoliche con OTSCC, riscontrata in circa l'80% dei casi, ma si parla anche di deficit nutrizionali, carenza di igiene orale, traumatismi orali cronici e predisposizione genetica.

1.3.1. Fumo di tabacco

Secondo numerosi studi è stato stabilito un rischio di sviluppare l'OTSCC da 5 a 9 volte maggiore nei soggetti con abitudini tabagiche rispetto a soggetti non esposti al fumo; inoltre è emerso che l'80% dei soggetti affetti da OTSCC è, o è stato, fumatore (Jovanovic et al., 1993). L'associazione tra fumo di tabacco e insorgenza di neoplasie maligne, tra cui l'OTSCC, è un dato ampiamente documentato in letteratura e confermato da moltissimi studi. Tale associazione è riconducibile all'azione cancerogena del tabacco e dei suoi prodotti di combustione (benzopirene, benzoantracene e nitrosammine) nonché, seppur in misura minore, all'irritazione termica a carico dei tessuti orali, soprattutto nella pratica del "reverse smoking" (Warnakulasuriya et al., 2005; Stich et al., 1992).

Il rischio di sviluppare OTSCC è dose-dipendente quindi proporzionale al numero di sigarette fumate (Moreno-Lopez et al., 2000).

Un dato caratteristico è emerso da uno studio che ha analizzato una pratica molto diffusa nel Sud-Est Asiatico che consiste nel masticare il “quid” (anche noto come “paan”), un composto di tabacco con foglie e noci di Betel (A. Catechu), e che è stata associata ad un rischio aumentato di insorgenza di neoplasia maligna del cavo orale (Wang et al., 2018).

1.3.2. Alcol

Ugualmente al fumo di tabacco, l'abuso di sostanze alcoliche rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza di molte patologie sistemiche, soprattutto le neoplasie maligne fra cui il carcinoma orale e l'OTSCC (Rehm, 2000).

L'azione cancerogena dell'alcol si espleta essenzialmente secondo meccanismi indiretti di potenziamento dell'azione cancerogena di altre sostanze mediante diversi pattern (Boffetta & Hashibe, 2006).

L'azione cancerogena diretta dell'alcol è da ricondurre al prodotto primario del suo metabolismo, ovvero l'acetaldeide, e alla concomitante presenza di altre sostanze (additivi o contaminanti) (Ogden, 2005).

Anche in questo caso il rischio è dose-dipendente (consumo quotidiano superiore a 10 g) ed è di fondamentale importanza ricordare l'effetto moltiplicativo che alcol e fumo hanno sul rischio di sviluppare OTSCC: un rischio aumentato di 10 volte rispetto ai singoli fattori di rischio considerati indipendentemente (Rehm, 2000; Goldstein et al., 2010; Bagnardi et al., 2001; Castellsague et al., 2004).

1.3.3. Altri fattori di rischio

Oltre al fumo e all'alcol sono stati studiati altri fattori di rischio correlati all'insorgenza delle neoplasie maligne del testa-collo, in primo luogo l'infezione da papillomavirus umano (HPV), importante fattore di rischio per il carcinoma della cervice uterina. E' oggetto di studio l'associazione del suddetto virus con il carcinoma orofaringeo e in maniera simile con l'OTSCC (Husain & Ramakrishnan, 2015; Syrjanen et al., 1983; Patel et al., 2011).

Tuttavia, ad oggi, non è ancora dimostrabile la correlazione tra l'aumento dell'incidenza di OTSCC e l'HPV, poiché la prevalenza di infezione da HPV in questo tipo di neoplasia non supera il 6,5% (Kim, Y.J. & J.H. Kim, 2020).

Importante è anche considerare una dieta poco equilibrata come altro fattore di rischio per le neoplasie del testa-collo. In particolar modo una dieta povera di frutta e verdura che contengono Vitamine A, C ed E, importanti per il ruolo oncoprotettori (Lucenteforte et al., 2009; Garavello et al., 2009; De Stefani et al., 2005; Lissowska et al., 2003; Neville & Day, 2002).

Infine, anche la predisposizione genetica è considerata un'importante fattore di rischio per l'insorgenza di OTSCC, probabilmente a causa di difetti di riparazione del DNA e della proliferazione cellulare (van Monsjou et al., 2013).

Da alcuni studi si è visto come, in presenza di alcune condizioni genetiche ereditarie (l'anemia di Fanconi, lo xeroderma pigmentosum, la sindrome di Bloom, la sindrome di Li-Fraumeni e l'ataxia teleangectasia), vi è un rischio di sviluppare un OTSCC aumentato di circa 700-1000 volte rispetto ai soggetti non affetti da tali condizioni (Paderno et al., 2018).

Ciò impone la necessità di effettuare un'anamnesi più approfondita, ponendo particolare attenzione alla storia oncologica familiare, in quanto i soggetti con anamnesi familiare positiva per i carcinomi orali sembrano avere un rischio aumentato di 3 volte di sviluppare un carcinoma orale soprattutto in associazione con altri fattori di rischio (Mork et al., 1999; Renkonen et al., 2017; Batra et al., 2003).

1.3.4. Fattori di rischio associati all'OTSCC nei giovani

Considerato il preoccupante aumento dei casi di OTSCC nei soggetti giovani, si è posta la necessità di indagare quali fossero i fattori predisponenti.

Si è visto che fumo e alcol, i due principali fattori di rischio per l'OTSCC, non sembrano avere un ruolo preponderante nei soggetti giovani in quanto in diversi studi i giovani affetti da OTSCC non fumano, o fumano moderatamente, e non abusano di sostanze alcoliche (Campbell et al., 2018; Byers, 1975; Amsterdam & Strawitz, 1982; Newman et al., 1983; Mascitti et al., 2020; Lee et al., 2007).

La spiegazione di tale evidenza, hanno ipotizzato alcuni ricercatori, sembra essere riconducibile ad un'insufficiente durata di esposizione alle sostanze cancerogene presenti nel fumo e nell'alcol nei soggetti giovani affetti da OTSCC (de Moraes et al., 2017).

Altro fattore di rischio esaminato in precedenza è l'HPV (genotipi ad alto rischio oncogeno: 16, 18, 31 e 33), considerato come una delle possibili cause del carcinoma orofaringeo, soprattutto in soggetti giovani non fumatori e non bevitori (Amin et al., 2017; Rahimi, 2020). Tale patogeno si pensa possa concorrere all'insorgenza anche dell'OTSCC poiché condivide alcuni tratti epidemiologici con il carcinoma dell'orofaringe ma, ad oggi, non si evidenziano relazioni chiare fra HPV e sviluppo di OTSCC (Kim, Y.J. and J.H. Kim, 2020; Campbell et al., 2018).

1.4 Considerazioni cliniche

All'esame clinico, basato su ispezione e palpazione, l'OTSCC si può manifestare principalmente in 4 forme (Figura 2):

- Forma esofitica (vegetante o verrucosa): si presenta come un'escrescenza rilevata, pluri-mammellonata, di colore bianco o bianco-rosa. Ha una consistenza tendenzialmente morbida eccetto che a livello della base di inserzione nel tessuto che si presenta lievemente più dura.
- Forma endofitica (nodulare o infiltrante): la variante nodulare si presenta alla palpazione come un nodulo duro e con limiti poco netti mentre quella infiltrante può raggiungere anche i piani

muscolari più profondi e dare una necrosi dell'area centrale oltre che deficit funzionali nel movimento della lingua.

- Forma ulcerata: è la variante più comune, si presenta come un'ulcerazione irregolare a bordi rilevati e induriti, ricoperta da materiale emorragico, fibrinoso e talvolta necrotico.
- Forma mista: è data dalla combinazione delle forme cliniche sopra elencate, soprattutto ulcero-vegetante.

Oltre a ciò, è importante sottolineare come i carcinomi orali, ugualmente ad altre neoplasie, spesso sono preceduti da disordini e condizioni potenzialmente maligne quali eritroplachia e leucoplachia (Bagan et al., 2010).

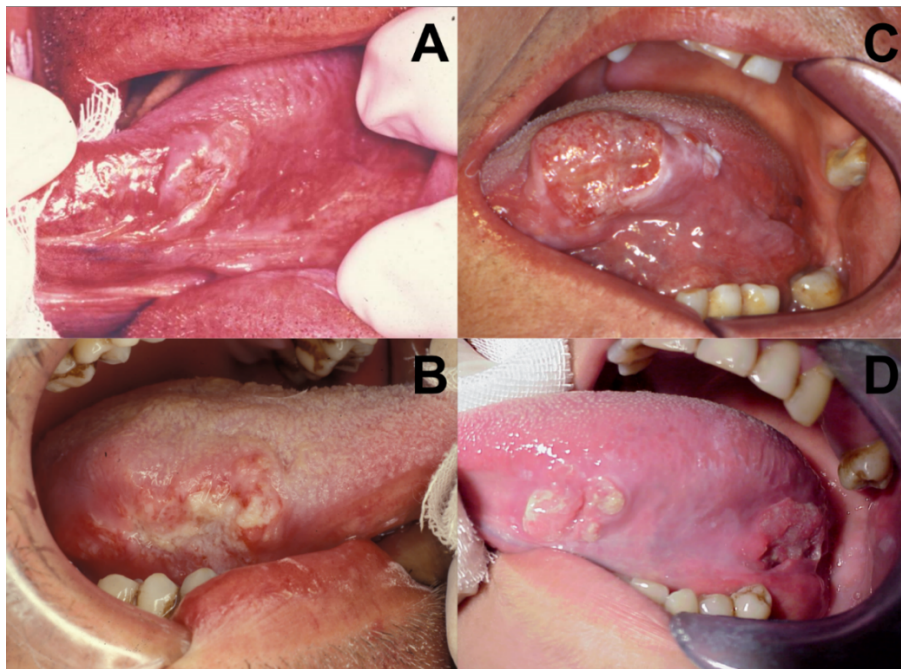


Figura 2: immagini esemplificative delle forme cliniche di OTSCC

1.4.1. Sintomatologia

Come detto precedentemente il carcinoma squamocellulare della lingua presenta forte tendenza all'invasione dei tessuti circostanti e della rete linfatica e perineurale, soprattutto nella forma infiltrante, generando una sintomatologia algica che si può associare, negli stadi più avanzati, a parestesie, fascicolazioni, alterata salivazione, sanguinamento, sino ad arrivare alla disfagia e disfonia

per un'alterata mobilità della lingua (Bagan et al., 2010; Prince & Bailey, 1999; Cuffari et al., 2006; Hechler et al., 2020).

1.4.2. Tendenza alla metastatizzazione

Rispetto alle altre sedi del cavo orale, la tendenza a metastatizzare del carcinoma squamocellulare della lingua è molto più elevata e precoce, interessando soprattutto i linfonodi sottomandibolari e sottomentali. La diffusione linfatica si valuta tramite la palpazione e le tecniche di imaging (ecografia, TC, RM) (Lindberg, 1972; Mascitti et al., 2018; Iftikhar et al., 2020).

Raramente possiamo riscontrare metastasi a distanza localizzate soprattutto a livello polmonare ma anche in fegato, ossa e cervello, valutabili tramite tecniche di imaging diverse rispetto al distretto corporeo interessato (Cai & Huang, 2019).

Infine, anche in questo caso, possiamo riscontrare la presenza di “secondi tumori primitivi” ovvero neoplasie situate in sedi diverse rispetto al tumore primario senza esserne metastasi o recidiva. Rispetto al tumore primario, tali neoplasie possono essere sincrone o metacrone, se si sviluppano entro i 2 anni dall'insorgenza del tumore primitivo (Merkx et al., 2006).

1.5 Diagnosi

Per una corretta diagnosi di carcinoma squamocellulare della lingua seguono 4 passaggi fondamentali: anamnesi ed esame obiettivo, biopsia ed esami strumentali.

1.5.1. Anamnesi ed esame obiettivo

In presenza di una lesione è importante che il clinico si concentri su alcuni aspetti fondamentali:

- Raccolta di eventuali fattori di rischio sopra elencati
- Storia familiare o personale di neoplasie

- Presenza di segni e sintomi riconducibili ad una lesione neoplastica quali: lesione che non guarisce e/o cresce rapidamente, parestesia/ipoestesia, alterazioni della motilità linguale, dolore, sanguinamento spontaneo, disfagia e disfonia (Tilstone, 2007).

L'esame obiettivo della lingua viene essenzialmente eseguito tramite l'ispezione e la palpazione; la prima è fondamentale per formulare un sospetto diagnostico, la seconda ne valuta la consistenza, i bordi e l'infiltrazione.

Fondamentale è anche l'esame dei tessuti extra-oral, con particolare attenzione ai linfonodi regionali (Akintoye & Mupparapu, 2020).

1.5.2. Biopsia

E' necessaria per confermare la presenza della neoplasia.

1.5.3. Esami strumentali

Le tecniche più utilizzate sono la TC, la RM, l'ecografia dei linfonodi del collo e la tomografia a emissione di positroni.

Sono fondamentali per valutare l'estensione della lesione, il coinvolgimento delle strutture anatomiche e l'eventuale presenza di metastasi (Ong & Chong, 2006; Arya & Pai, 2012).

1.6 Stadiazione

Analogamente ad altre neoplasie maligne, anche per stadiare il carcinoma squamocellulare della lingua si utilizza la classificazione TNM che può essere clinica (cTNM) o patologica (pTNM). La classificazione clinica (cTNM) si basa su dati raccolti tramite l'esame obiettivo, l'imaging e la biopsia per la conferma diagnostica.

La classificazione patologica (pTNM) deriva invece dall'esame microscopico dei campioni operatori effettuata dal patologo.

In entrambi i sottotipi di classificazione TNM vengono valutati 3 parametri:

- lo spessore del tumore primitivo (T), con riferimento alla profondità d'invasione (DOI)
- la presenza o meno di metastasi linfonodali loco-regionali (N)
- la presenza o meno di metastasi a distanza (M) (Amin & Edge, 2017)

1.6.1. Classificazione clinica (cT) e patologica (pT) del tumore primitivo

Il parametro cT viene valutato tramite un esame obiettivo approfondito seguito da esami di imaging, essenzialmente TC o RM (Tabella 1). La diagnostica per immagini ha l'obiettivo di valutare la lingua e i tessuti circostanti (Li et al., 2014).

La biopsia sarà fondamentale per confermare la diagnosi e può essere seguita da agobiopsia in sede linfonodale.

Il parametro pT viene valutato dal patologo mediante esame microscopico, considerando le stesse caratteristiche della classificazione clinica (Umstattd et al., 2017).

Tabella 1. Classificazione clinica e patologica del tumore primitivo (cT, pT).

Categoria T	Criteri
TX	Non è possibile individuare il tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ (il tumore non ha superato la membrana basale)
T1	Tumore con spessore ≤ 2 cm, con un DOI ≤ 5 mm
T2	Tumore ≤ 2 cm, con un DOI > 5 mm ma ≤ 10 mm Tumore > 2 cm ma ≤ 4 cm, con un DOI ≤ 10 mm
T3	Tumore > 4 cm; oppure un DOI > 10 mm
T4	Tumore primitivo in stadio avanzato
T4a	Tumore che invade le strutture anatomiche adiacenti (es: la corticale ossea)
T4b	Cavo orale: tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o la carotide interna.

1.6.2. Classificazione clinica (cN) e patologica (pN) delle metastasi linfonodali

Viene valutato il coinvolgimento dei linfonodi loco-regionali soprattutto del collo in base alla localizzazione (ipsilaterale, controlaterale e bilaterale), al numero, alle dimensioni, alla mobilità e al rapporto con i piani profondi. Per quanto riguarda quest'ultimo fattore se si presenta la fissità del linfonodo rispetto ai piani più profondi è necessario indagare l'eventuale estensione extranodale (ENE) (Tabella 2) (Gu et al., 2010).

Ricordiamo che per definire il parametro pN è necessario che all'esame istologico siano compresi almeno 10 linfonodi esenti da metastasi dopo intervento di dissezione selettiva del collo o almeno 15 linfonodi in caso di dissezione radicale del collo (Tabella 3) (Amin & Edge, 2017).

Tabella 2. Classificazione clinica (cN) delle metastasi linfonodali

Categoria N	Criteri
NX	Non è possibile individuare i linfonodi locoregionali
N0	Assenza di metastasi ai linfonodi locoregionali
N1	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale ≤ 3 cm, ENE (-)
N2	Malattia metastatica moderata
N2a	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale > 3 cm ma ≤ 6 cm, ENE (-)
N2b	Metastasi linfonodali multiple ipsilaterali ≤ 6 cm, ENE (-)
N2c	Metastasi linfonodali bilaterali o controlaterali ≤ 6 cm, ENE (-)
N3	Malattia metastatica avanzata
N3a	Metastasi in almeno un linfonodo > 6 cm, ENE (-)
N3b	Metastasio in almeno un linfonodo clinicamente ENE (+)

Tabella 3. Classificazione patologica (pN) nelle metastasi linfonodali

Categoria N	Criteri
NX	Non è possibile individuare i linfonodi locoregionali
N0	Assenza di metastasi ai linfonodi locoregionali
N1	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale ≤ 3 cm, ENE (-)
N2	Malattia metastatica moderata
N2a	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale ≤ 3 cm, ENE (+) Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale > 3 cm ma ≤ 6 cm, ENE (-)
N2b	Metastasi linfonodali multiple ipsilaterali ≤ 6 cm, ENE (-)
N2c	Metastasi linfonodali bilaterali o controlaterali ≤ 6 cm, ENE (-)
N3	Malattia metastatica avanzata
N3a	Metastasi in almeno un linfonodo > 6 cm, ENE (-)
N3b	Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale > 3 cm, ENE (+) Metastasi linfonodali multiple con almeno un linfonodo ENE (+)

1.6.3. Classificazione clinica (cM) e patologica (pM) delle metastasi distanza

La valutazione delle metastasi a distanza si basa principalmente su TC total body e PET/CT. Il parametro pM1 è accertato dopo conferma tramite esame biotico (Tabella 4) (Amin & Edge, 2017).

Tabella 4. Classificazione clinica (cM) e patologica (pM) delle metastasi a distanza

Categoria M	Criteri
M0	Nessuna evidenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

Una volta definiti i parametri T, N e M, questi vengono combinati e raggruppati in stadi al fine di definire una stratificazione prognostica dell'OTSCC (Tabella 5).

Tabella 5. Raggruppamento in stadi prognostici

Stadio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
IVa	T4a	N0,1	M0
	T1-4a	N2	M0
IVb	T1-4b	N3	M0
	T4b	N0-3	M0
IVc	T1-4b	N0-3	M1

1.7 Trattamento

Grazie alla stadiazione del carcinoma squamocellulare della lingua comprendiamo non soltanto la sua localizzazione ed estensione a livello loco-regionale e sistemico ma questa ci consente anche di delineare quale sia il trattamento più adeguato.

Le scelte terapeutiche vertono principalmente sull'intervento chirurgico o sulla radioterapia e talvolta l'associazione delle due strategie.

Infatti, nei casi di neoplasia in stadio iniziale (T1) la terapia prevede brachiterapia interstiziale (infissione di preparati radioattivi nella sede tumorale) o radioterapia, soprattutto se ci sono fattori compromettenti l'intervento chirurgico.

Per le neoplasie con estensione massima entro T2 invece il trattamento di elezione è l'asportazione chirurgica ovvero la rimozione dell'intera massa neoplastica (radicalità chirurgica) cercando di ottenere un campione con margini privi di cellule cancerose. Tuttavia, la radicalità chirurgica spesso risulta difficile a causa della tendenza del tumore stesso di infiltrare i piani profondi con conseguente necessità di attuare interventi più demolitivi (Licitra et al., 2016; Prince & Bailey, 1999).

Negli stadi più avanzati (T3 e T4) spesso è necessario associare la rimozione chirurgica alla radio/chemioterapia (Calabrese et al., 2011).

Nei casi di tumori non asportabili per uno stadio troppo avanzato o per altre controindicazioni, si procede con l'associazione radio-chemioterapica, solo se il paziente risulta essere in grado di sostenerne l'elevato impatto biologico (Pignon et al., 2009).

Gli ultimi studi vertono sull'utilizzo di farmaci biologici, come alternativa alla chemioterapia tradizionale per i tumori in stadio avanzato, dotati di un meccanismo di azione in grado di alterare specifici processi dello sviluppo tumorale. In modo particolare è stato approvato dal 2006 il Cetuximab per i tumori del testa-collo (Kundu & Nestor, 2012; Gildener-Leapman et al., 2013).

Per quanto riguarda il trattamento delle metastasi linfonodali risulta necessario fare una distinzione nei pazienti clinicamente positivi (cN1-N3) o clinicamente negativi.

In caso di pazienti clinicamente positivi è necessario procedere con la dissezione chirurgica dei linfonodi del collo, mentre in quelli clinicamente negativi è ancora oggetto di studio la necessità di effettuare l'intervento chirurgico (Licitra, 2011; Ibrahim et al., 2020). Molti sostengono che risulta migliore considerare un periodo di osservazione e valutazione per evitare l'eventuale over treatment (Jesse et al., 1970); secondo altri, posto il rischio di metastasi subcliniche, la dissezione del collo comporterebbe l'asportazione di eventuali metastasi evitando il rischio di recidiva e la necessità di un ulteriore intervento (Haddadin et al., 1999; D'Cruz et al., 2015; Abu-Ghanem et al., 2016).

Per lo stadio N0 in pazienti con OTSCC precoci (T1-T2) la tecnica bioptica a carico del linfonodo sentinella sembra essere una tecnica attendibile (Schilling et al., 2015).

CAPITOLO 2. ENZIMA NICOTINAMIDE N-METILTRANSFERASI (NNMT) E CATECOL-O-METILTRANSFERASI (COMT)

2.1 *Enzima nicotinamide N-metiltransferasi (NNMT)*

2.1.1 *Metabolismo dei farmaci*

I farmaci e numerose sostanze estranee all'organismo, definite xenobiotici, devono essere metabolizzati per poter essere eliminati. Il metabolismo degli xenobiotici rappresenta un fondamentale meccanismo di difesa dell'organismo e avviene prevalentemente a livello epatico attraverso due successive fasi enzimatiche.

La fase I, detta anche di funzionalizzazione, comprende reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi catalizzate principalmente da enzimi quali il citocromo P450, le monoamino ossidasi, le flavina-monoossigenasi, le alcol e aldeide deidrogenasi, le colinesterasi e le epossido idrolasi. Queste reazioni introducono o espongono gruppi funzionali sulla molecola, aumentandone la polarità e preparandola alle successive trasformazioni metaboliche.

La fase II, o fase di coniugazione, consiste invece nel legame del composto, o del suo metabolita derivato dalla fase I, con molecole endogene altamente polari, favorendone l'escrezione. Le reazioni sono catalizzate da enzimi citosolici appartenenti a diverse famiglie, tra cui glutathione S-transferasi, N-acetiltransferasi, sulfotransferasi, UDP-glucuroniltransferasi e metiltransferasi.

Tra gli enzimi coinvolti nelle reazioni di fase II rivestono particolare interesse le metiltransferasi, responsabili del trasferimento di un gruppo metile su differenti substrati biologici. In base all'atomo coinvolto nella reazione, tali enzimi vengono distinti in S-, O- e N-metiltransferasi. Le tiolo-metiltransferasi (TMT) e le tiopurina-metiltransferasi (TPMT) catalizzano reazioni di S-metilazione di diversi farmaci, mentre la catecol-O-metiltransferasi (COMT) e la fenol-O-metiltransferasi (POMT) intervengono nella O-metilazione delle catecolamine e di altri composti fenolici. La nicotinamide N-metiltransferasi (NNMT), insieme all'istamina N-metiltransferasi (HNMT), appartiene invece alle N-

metiltransferasi ed è responsabile del trasferimento di un gruppo metile all'azoto piridinico della nicotinamide e di altri composti strutturalmente correlati (Jancova et al., 2010).

2.1.2. Funzioni biologiche NNMT

La nicotinamide, nota anche come vitamina B3, niacinamide o vitamina PP, rappresenta il principale precursore del nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+) e del nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP^+), due coenzimi essenziali coinvolti in numerose reazioni di ossidoriduzione e nei processi metabolici cellulari (Cantó et al., 2015).

Oltre al loro ruolo nel metabolismo energetico, NAD^+ e NADP^+ partecipano a importanti processi biologici, tra cui la deacetilazione degli istoni mediata dalle sirtuine, la sintesi di secondi messaggeri intracellulari coinvolti nella regolazione del calcio e le reazioni di ADP-ribosilazione catalizzate dalle poli(ADP-ribosio)-polimerasi (PARPs) e dalle mono-ADP-ribosiltransferasi, fondamentali nei meccanismi di riparazione del DNA e nella regolazione dell'espressione genica (Cantó et al., 2015; Pissios et al., 2017).

La nicotinamide presente nell'organismo può derivare da diverse fonti. La principale è rappresentata dall'assunzione alimentare, con successivo assorbimento a livello intestinale. In alternativa, può essere sintetizzata a partire dal triptofano attraverso il pathway della chinurenina, sebbene questa via contribuisca solo in minima parte al mantenimento dei livelli intracellulari. Un'ulteriore fonte è costituita dal catabolismo del NAD^+ epatico, che libera nicotinamide successivamente immessa nel circolo ematico (Kumar et al., 2013; Booth et al., 2015).

Il fegato rappresenta il principale organo deputato al metabolismo della nicotinamide. In questo distretto interviene la nicotinamide N-metiltrasferasi, che catalizza la metilazione dell'azoto piridinico della nicotinamide utilizzando la S-adenosil-L-metionina (SAM) come donatore del gruppo metile. Il prodotto della reazione, N^1 -metilnicotinamide (MNA), può essere eliminato direttamente per via

urinaria oppure essere ulteriormente ossidato in derivati piridonici, anch'essi escreti attraverso il rene. Attraverso questa reazione, la NNMT svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi della nicotinamide e del metabolismo del NAD^+ , contribuendo alla regolazione dell'equilibrio metabolico cellulare (Richard et al., 2009; Nikiforov et al., 2011).

2.1.3. Ruolo dell'NNMT umana

La nicotinamide N-metiltrasferasi è un enzima citosolico appartenente alla famiglia delle metiltransferasi coinvolte nelle reazioni di fase II del metabolismo degli xenobiotici. La sua principale funzione consiste nel catalizzare la metilazione dell'azoto piridinico della nicotinamide e di altri analoghi strutturali della piridina, utilizzando la S-adenosil-L-metionina (SAM) come donatore del gruppo metile. In seguito alla reazione enzimatica si forma N¹-metilnicotinamide (MNA), mentre la SAM viene convertita in S-adenosil-L-omocisteina (SAH), successivamente idrolizzata in omocisteina e adenosina.

L'N¹-metilnicotinamide rappresenta il principale prodotto della reazione catalizzata dalla NNMT e può seguire differenti destini metabolici. Una parte viene eliminata direttamente attraverso le urine, mentre un'altra viene ulteriormente ossidata dall'aldeide ossidasi con formazione di N¹-metil-2-piridone-5-carbossiamide e N¹-metil-4-piridone-3-carbossiamide, anch'essi escreti per via renale (Hiratsuka et al., 2014).

Le prime caratterizzazioni biochimiche dell'enzima sono state effettuate su estratti di tessuto epatico umano mediante metodiche cromatografiche e radiochimiche che hanno consentito di identificare e quantificare il prodotto della reazione enzimatica. Tali studi hanno dimostrato che la NNMT è una proteina citoplasmatica con attività ottimale a pH fisiologico (circa 7,4) e hanno permesso di definirne le principali caratteristiche cinetiche. In particolare, è stata osservata un'ampia variabilità dell'attività enzimatica nei diversi campioni analizzati, inizialmente attribuita alla possibile presenza di

polimorfismi genetici. Tuttavia, successive analisi del gene codificante la NNMT non hanno evidenziato mutazioni in grado di giustificare completamente tali differenze di attività. È stato inoltre dimostrato che i principali prodotti della reazione, N¹-metilnicotinamide e S-adenosil-L-omocisteina, esercitano un'importante azione di feedback negativo sull'attività dell'enzima (Aksoy et al.).

La purificazione della NNMT da tessuto epatico e la successiva espressione della proteina ricombinante hanno consentito di approfondirne le caratteristiche strutturali e funzionali. La proteina umana è costituita da 264 amminoacidi e presenta un peso molecolare di circa 29,6 kDa. Il confronto tra l'enzima nativo e quello ricombinante ha evidenziato parametri cinetici sostanzialmente sovrapponibili, confermando che la proteina ricombinante riproduce fedelmente le proprietà biologiche dell'enzima fisiologico (Okamoto et al., 2003).

Il gene che codifica per la NNMT è localizzato sul cromosoma 11, nella regione 11q23.1, ed è costituito da tre esoni e due introni, per una lunghezza complessiva di circa 16,5 kb. La sua espressione è regolata da un promotore particolarmente attivo localizzato a monte del sito di inizio della trascrizione. Diversi fattori trascrizionali sono coinvolti nella regolazione dell'attività del gene, tra cui HNF-1 β , STAT3, TGF- β 1 e l'interleuchina-6 (IL-6), molecole che in differenti modelli cellulari sono risultate capaci di incrementare l'espressione della NNMT. In particolare, l'attivazione di STAT3 da parte dell'IL-6 e l'azione di HNF-1 β sono state associate ad un aumento della trascrizione del gene in diversi tipi cellulari, comprese linee di carcinoma mammario, coloretale, epatico e tiroideo (Aksoy et al.).

L'espressione della NNMT non è limitata al fegato, dove risulta particolarmente abbondante, ma è stata documentata anche in numerosi altri organi e tessuti, tra cui rene, polmone, muscolo scheletrico, cuore, milza, prostata, tiroide, stomaco, intestino, placenta, testicolo, ovaio, midollo osseo, ghiandola surrenale e in alcune regioni del sistema nervoso centrale, suggerendo un ruolo biologico più ampio rispetto al solo metabolismo della nicotinamide (Aksoy et al.).

La risoluzione della struttura tridimensionale della NNMT mediante cristallografia a raggi X ha consentito di identificare il sito catalitico dell'enzima e i principali residui amminoacidici coinvolti nella reazione di metilazione. In particolare, gli amminoacidi tirosina 20 (Y20) e acido aspartico 197 (D197) sono risultati fondamentali per l'attività catalitica, come confermato da esperimenti di mutagenesi sito-specifica (Aksoy et al., 1994).

Sebbene la nicotinamide rappresenti il substrato fisiologico dell'enzima, numerosi studi hanno dimostrato che la NNMT è in grado di metilare anche altri composti strutturalmente simili alla piridina. Tra questi figurano il norharman e la 4-fenilpiridina, molecole coinvolte nella fisiopatologia del morbo di Parkinson. Più recentemente, lo sviluppo di metodiche basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (UHPLC-HILIC-MS) ha consentito di identificare nuovi substrati e potenziali inibitori della NNMT, aprendo nuove prospettive per lo studio della funzione biologica dell'enzima e per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate (Pissios et al., 2017; Aksoy et al., 1994).

2.1.4. Ruolo dell'NNMT nelle patologie neoplastiche

Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato un coinvolgimento della nicotinamide N-metiltransferasi nello sviluppo e nella progressione di diverse patologie neoplastiche. In particolare, l'enzima risulta frequentemente overespresso sia a livello di RNA messaggero sia di proteina cataliticamente attiva in un ampio numero di tumori solidi, suggerendo un suo ruolo nei processi di carcinogenesi e di progressione tumorale.

Tra le neoplasie maggiormente studiate riveste particolare interesse il carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC), nel quale è stata dimostrata una significativa overespressione della NNMT rispetto al tessuto sano. Inoltre, i livelli di espressione dell'enzima risultano correlati con importanti parametri clinico-patologici, quali lo stadio della malattia, il parametro pT, il grado di

differenziamento istologico e la presenza di metastasi linfonodali (Sartini et al., 2007; Emanuelli et al., 2010). Tali osservazioni suggeriscono che la NNMT possa rappresentare un potenziale biomarcatore diagnostico e prognostico per questa neoplasia.

L'espressione dell'enzima è stata inoltre valutata nella saliva di pazienti affetti da OSCC, evidenziando livelli significativamente superiori rispetto ai soggetti sani. Questo risultato ha aperto nuove prospettive per lo sviluppo di metodiche diagnostiche non invasive basate sull'analisi dei fluidi biologici (Sartini et al., 2012).

Per chiarire il ruolo biologico della NNMT nella progressione del carcinoma orale sono stati condotti studi di silenziamento genico mediante RNA interference (RNAi) nelle linee cellulari KB e PE/CA-PJ15. La riduzione dell'espressione dell'enzima ha determinato una significativa diminuzione della proliferazione cellulare e della capacità tumorigenica in vivo, evidenziando un diretto coinvolgimento della NNMT nella crescita della cellula neoplastica (Pozzi et al., 2011; Pozzi et al., 2013). Al contrario, l'overespressione dell'enzima nella linea cellulare HSC-2 ha determinato un aumento della capacità proliferativa delle cellule di OSCC, confermando il ruolo pro-tumorale della NNMT (Seta et al., 2019).

Un ulteriore ambito di ricerca riguarda il rapporto tra NNMT e cellule staminali tumorali (Cancer Stem Cells, CSCs). Studi condotti sulla linea cellulare Hep-2 di carcinoma della laringe hanno evidenziato una marcata overespressione dell'enzima nelle popolazioni arricchite in CSCs rispetto alle cellule parentali (Pozzi et al., 2015). Analogamente, sistemi sperimentali di arricchimento in cellule staminali ottenuti da linee cellulari di carcinoma della vescica, del polmone, del colon-retto e dell'osteosarcoma hanno dimostrato un aumento sia dell'espressione dell'NNMT sia dei principali marcatori di staminalità (Pozzi et al., 2020). Poiché le CSCs sono considerate responsabili della progressione tumorale, della formazione di metastasi, della chemioresistenza e delle recidive, tali

risultati suggeriscono un ruolo centrale dell'enzima nel mantenimento del fenotipo tumorale più aggressivo.

Recentemente è stata inoltre osservata un'espressione differenziale della NNMT nelle lesioni odontogene, in particolare tra ameloblastoma e cheratocisti odontogene primarie e recidivanti. Questi dati suggeriscono un possibile impiego dell'enzima come marcatore prognostico anche nell'ambito della patologia odontogena (Mascitti et al., 2020).

Nonostante la frequente overespressione della NNMT in numerose neoplasie, i meccanismi attraverso i quali l'enzima promuove la progressione tumorale non sono ancora completamente chiariti. Studi di metabolomica hanno dimostrato che un'elevata attività della NNMT determina una riduzione intracellulare dei livelli di S-adenosil-L-metionina (SAM), principale donatore di gruppi metilici della cellula. La conseguente alterazione dello stato di metilazione determina un quadro di ipometilazione degli istoni che favorisce l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nella progressione tumorale (Ulanovskaya et al., 2013; Shlomi et al., 2013).

L'overespressione della NNMT è stata successivamente descritta in numerose altre neoplasie. Nel glioblastoma multiforme sono stati rilevati elevati livelli di RNA messaggero e di attività enzimatica rispetto al tessuto cerebrale normale (Markert et al., 2001; Yamada et al., 2010). Nel carcinoma mammario, l'enzima risulta espresso nelle linee cellulari resistenti all'adriamicina, mentre è assente nelle linee sensibili al trattamento (Gehrmann et al., 2004; Peng et al., 2009). Esperimenti di silenziamento della NNMT hanno inoltre dimostrato una riduzione della proliferazione cellulare, della capacità di formare colonie e della tumorigenicità, associata ad un aumento dell'apoptosi e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Al contrario, l'overespressione dell'enzima favorisce la crescita cellulare e riduce l'apoptosi, indicando come il silenziamento della NNMT possa rappresentare una potenziale strategia terapeutica (Zhang et al., 2014).

Anche nel carcinoma tiroideo è stata osservata un'importante overespressione della NNMT, soprattutto nell'istotipo papillare, con elevati livelli sia di attività enzimatica sia di proteina, assente invece nel tessuto tiroideo sano e negli adenomi follicolari (Xu et al., 2005). Analogamente, nel carcinoma pancreatico l'enzima risulta significativamente up-regolato rispetto ai tessuti non neoplastici e i suoi livelli di espressione sono correlati allo stadio, alle dimensioni e al grado di differenziamento della neoplasia. Esperimenti condotti sulla linea cellulare PANC-1 hanno inoltre dimostrato che il silenziamento della NNMT riduce la proliferazione cellulare, mentre la sua overespressione promuove crescita e invasività, soprattutto in condizioni di stress metabolico (Rogers et al., 2006; Xu et al., 2016; Yu et al., 2015). Un ruolo analogo è stato descritto anche nel carcinoma coloretale, dove l'up-regolazione della NNMT promuove proliferazione, formazione di colonie e tumorigenesi, riducendo contemporaneamente apoptosi e livelli intracellulari di ROS. Inoltre, l'enzima sembra contribuire alla resistenza al trattamento con 5-fluorouracile, limitando l'attivazione dei meccanismi apoptotici indotti dal farmaco (Xie et al., 2016).

Nel carcinoma gastrico, elevati livelli di espressione della NNMT sono stati associati alle dimensioni del tumore, alla presenza di metastasi linfonodali e allo stadio clinico. La down-regolazione dell'enzima determina invece una riduzione della proliferazione, della migrazione e della capacità invasiva delle cellule neoplastiche (Jang et al., 2004; Chen et al., 2016).

Complessivamente, le evidenze disponibili indicano che la NNMT svolge un ruolo importante nella biologia della cellula tumorale, influenzando processi quali proliferazione, metabolismo energetico, invasività, migrazione cellulare, mantenimento delle cellule staminali tumorali e resistenza ai trattamenti antitumorali. Per tali motivi, l'enzima rappresenta oggi un promettente biomarcatore diagnostico e prognostico, oltre che un potenziale bersaglio terapeutico in numerose neoplasie, incluso il carcinoma squamocellulare del cavo orale.

2.2 *Enzima catecolo-O-metiltransferasi (COMT)*

La catecol-O-metiltransferasi (COMT) è un enzima appartenente alla classe delle metiltransferasi e svolge un ruolo fondamentale nei processi di biotrasformazione e detossificazione cellulare. Essa partecipa alle reazioni di fase II del metabolismo, catalizzando il trasferimento di un gruppo metile dalla S-adenosil-L-metionina (SAM) alle catecolammine o ai catecolestrogeni contribuendo all'inattivazione metabolica di numerose molecole endogene ed esogene e alla successiva eliminazione dall'organismo (Bonifacio et al., 2007).

L'enzima fu identificato per la prima volta nel 1958 da Axelrod e Tomchick durante studi condotti su pazienti affetti da feocromocitoma, tumore che colpisce la regione midollare del surrene, nei quali furono rilevati metaboliti O-metilati delle catecolammine nelle urine. Da allora la COMT è stata ampiamente studiata per il suo ruolo nel metabolismo delle catecolammine, degli estrogeni e di numerosi composti xenobiotici (Yager, J.D., 2012).

Nell'uomo il gene COMT è localizzato sulla regione cromosomica 22q11.21 e codifica per due principali isoforme proteiche: una forma solubile citoplasmatica (S-COMT) e una forma associata alle membrane cellulari (MB-COMT), le quali derivano da differenti meccanismi di trascrizione dello stesso gene e presentano una diversa distribuzione tissutale. Infatti la MB-COMT è predominante nel sistema nervoso centrale, soprattutto a livello delle aree ipotalamiche, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, dove ha un ruolo principale di inattivazione di neurotrasmettitori come dopamina e noradrenalina; mentre la S-COMT è maggiormente rappresentata nei tessuti periferici, soprattutto nel fegato e nel rene, sedi principali dei processi di detossificazione sistemica (Yager, 2012; Carta et al., 2018; Wang et al., 2021).

2.2.1 Funzioni biologiche

La reazione catalizzata da COMT consiste nella O-metilazione di substrati caratterizzati dalla presenza di un anello catecolico. Il gruppo metile viene trasferito dalla SAM al substrato accettore con formazione di un composto O-metilato e di S-adenosil-omocisteina (SAH). Questo processo determina generalmente una riduzione dell'attività biologica della molecola bersaglio e ne facilita l'eliminazione.

I principali substrati dell'enzima comprendono i neurotrasmettitori catecolamminici, dopamina, adrenalina e noradrenalina, gli xenobiotici e i catecolestrogeni, ossia i metaboliti degli estrogeni estrone ed estradiolo (Bonifacio et al., 2007; Rutherford et al., 2008; Thompson, 2019; Roth, 1992). In particolare, la metilazione dei catecolestrogeni riveste particolare interesse in ambito oncologico. Questi metaboliti derivano dall'ossidazione degli estrogeni e possono generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) e intermedi altamente reattivi in grado di interagire con il DNA. L'accumulo di tali composti è stato associato all'insorgenza di danni ossidativi, mutazioni genomiche e alterazioni dei processi di regolazione cellulare. Attraverso la loro metilazione, COMT contribuisce alla formazione di metossiestrogeni, molecole dotate di una minore attività genotossica e considerate potenzialmente protettive nei confronti della trasformazione neoplastica.

L'importanza biologica di COMT risiede pertanto nella sua capacità di limitare l'accumulo intracellulare di metaboliti potenzialmente tossici che può favorire fenomeni di stress ossidativo cronico, danno al DNA e alterazione dell'equilibrio proliferativo cellulare, processi riconosciuti come eventi chiave nelle fasi iniziali della carcinogenesi e nella progressione tumorale (Thompson, 2019).

2.2.2 Polimorfismi

Il gene COMT è caratterizzato da un'elevata variabilità genetica ed è sede di numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), molti dei quali sono in grado di

modificare l'attività enzimatica e, di conseguenza, influenzare il metabolismo delle catecolamine e di altri substrati contenenti un anello catecolico.

Tra i diversi polimorfismi identificati, quello maggiormente studiato è rs4680, noto anche come Val158Met per l'isoforma MB-COMT e Val108Met per la S-COMT. Tale variante deriva dalla sostituzione di una guanina (G) con un'adenina (A) nel gene COMT, determinando la sostituzione dell'amminoacido valina (Val) con metionina (Met) rispettivamente al codone 158 della forma di membrana e al codone 108 della forma solubile dell'enzima.

Questa variazione determina un'importante modifica delle proprietà funzionali della proteina. In particolare, la presenza della metionina rende l'enzima meno stabile dal punto di vista conformazionale e più suscettibile alla degradazione, con una conseguente riduzione della sua attività catalitica. Gli individui portatori del genotipo Met/Met presentano infatti un'attività enzimatica ridotta di circa il 40% rispetto ai soggetti omozigoti Val/Val, mentre gli eterozigoti Val/Met mostrano valori intermedi (Cruz-Vicente et al., 2022).

La diminuzione dell'attività della COMT comporta una più lenta inattivazione delle catecolamine, in particolare della dopamina, favorendone l'accumulo a livello dei tessuti nei quali l'enzima svolge un ruolo predominante. Al contrario, il genotipo Val/Val, associato ad una maggiore attività enzimatica, determina una più rapida O-metilazione e degradazione dei neurotrasmettitori catecolaminici, contribuendo a ridurre la concentrazione intracellulare (Wang et al., 2021).

Dal punto di vista strutturale, la sostituzione della valina con la metionina modifica la conformazione del dominio catalitico della proteina. La metionina, infatti, possiede una catena laterale più voluminosa rispetto alla valina e ciò rende il sito attivo maggiormente suscettibile a variazioni conformazionali, influenzando negativamente l'efficienza catalitica dell'enzima (Carta et al., 2018).

L'interesse verso il polimorfismo rs4680 è legato soprattutto al suo possibile coinvolgimento nello sviluppo di numerose patologie del sistema nervoso centrale. Diversi studi hanno infatti evidenziato un'associazione tra questa variante genetica e disturbi neuropsichiatrici quali schizofrenia, depressione, disturbo ossessivo-compulsivo e malattia di Parkinson, sebbene i risultati disponibili non siano sempre concordi e il ruolo del polimorfismo debba essere interpretato considerando anche l'interazione con altri fattori genetici e ambientali (Thompson et al., 2019).

Negli ultimi anni il polimorfismo rs4680 è stato oggetto di numerose ricerche anche nell'ambito oncologico. In particolare, è stato osservato che il genotipo Val/Val, caratterizzato da una maggiore attività della COMT, potrebbe esercitare un effetto protettivo nei confronti della progressione del carcinoma della vescica non muscolo-invasivo, mentre la variante Met/Met sembrerebbe associarsi ad un rischio più elevato di progressione della malattia (Carta et al., 2018).

Un ulteriore elemento di interesse riguarda l'interazione tra COMT e gli enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. È stato infatti ipotizzato che la contemporanea presenza del genotipo Val/Val della COMT e della forma nativa della manganese superossido dismutasi (MnSOD) possa esercitare un effetto sinergico nel limitare la progressione del carcinoma vescicale, grazie ad una maggiore capacità di neutralizzare i metaboliti ossidanti e di mantenere l'equilibrio redox cellulare (Cruz-Vicente et al., 2022).

Anche la risposta individuale ad alcune strategie di prevenzione potrebbe essere influenzata dalla variabilità genetica di COMT. Studi clinici condotti in popolazioni femminili ad elevato rischio oncologico hanno infatti evidenziato che il polimorfismo rs4680 può modificare l'effetto protettivo dell' α -tocoferolo (vitamina E) nei confronti dello sviluppo di alcune neoplasie. Tali risultati sottolineano come le differenze genetiche individuali possano influenzare il metabolismo degli xenobiotici e la risposta dell'organismo a specifici interventi preventivi o terapeutici (Thompson et al., 2019).

2.2.3 Ruolo della COMT nelle patologie neoplastiche

Negli ultimi anni numerose evidenze hanno suggerito un possibile ruolo della catecol-O-metiltransferasi nella carcinogenesi e progressione tumorale. Grazie alla sua attività di O-metilazione, l'enzima contribuisce alla detossificazione di metaboliti potenzialmente genotossici, limitando lo stress ossidativo e il danno al DNA. In modo particolare, il ruolo della COMT è stato ampiamente studiato nel carcinoma mammario, dove studi condotti su campioni di tessuto mammario provenienti da soggetti donatori hanno dimostrato che l'accumulo di catecolestrogeni e dei loro metaboliti reattivi favorisce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi uno stato di stress ossidativo cronico, condizione associata allo sviluppo della neoplasia. In risposta all'eccessiva presenza di catecoli, l'attività della COMT risulta aumentata e la sua localizzazione a livello nucleare potrebbe rappresentare un potenziale biomarcatore dell'accumulo di catecolestrogeni.

Ulteriori evidenze suggeriscono che il genotipo Val/Val del gene COMT favorisca la conversione dei catecolestrogeni in metossi estrogeni, metaboliti dotati di un'azione protettiva nei confronti del DNA, in quanto limitano i danni indotti dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate durante il metabolismo ossidativo degli estrogeni. Tuttavia, nel carcinoma mammario, l'alterazione del metabolismo estrogenico conseguente alla regolazione dell'attività di COMT sembrerebbe determinare un incremento dell'espressione del gene CCND1, responsabile della sintesi della ciclina D1, una proteina essenziale per la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. L'aumento dei livelli di ciclina D1 favorirebbe quindi la proliferazione cellulare, contribuendo, insieme alla ridotta detossificazione dei metaboliti estrogenici, allo sviluppo del tumore mammario ((Weisz et al., 2000)).

Alcuni studi hanno inoltre ipotizzato che l'elevata attività enzimatica associata al genotipo omozigote Val/Val possa esercitare un effetto protettivo nei confronti di diverse neoplasie. In particolare, tale

variante sembrerebbe ridurre il rischio di sviluppare tumori estrogeno-dipendenti nelle donne, carcinoma della prostata negli uomini e linfomi non-Hodgkin.

Un possibile ruolo della COMT è stato descritto anche nel carcinoma gastrico poiché l'enzima è normalmente espresso nella mucosa gastrica dove contribuisce alla protezione del DNA dai danni ossidativi attraverso la metilazione di composti endogeni ed esogeni. In questo contesto, alcuni polimorfismi del gene COMT potrebbero influenzare la metilazione dei geni p14 e p16, frequentemente alterati nelle lesioni precancerose e nel carcinoma gastrico. Le proteine codificate da questi geni, p14ARF e p16INK4a, svolgono infatti un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA e nei processi apoptotici; una loro alterazione può quindi contribuire alla progressione della neoplasia (Tahara et al., 2009).

La COMT interviene inoltre nell'inattivazione dei metaboliti catecolici del 17 β -estradiolo, tra cui 2-idrossiestradiolo e 4-idrossiestradiolo, molecole in grado di promuovere la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di stimolare la proliferazione delle cellule dell'epitelio superficiale ovarico (OSE). L'accumulo di tali metaboliti può aumentare la suscettibilità delle cellule alla trasformazione neoplastica. Studi su pazienti affette da carcinoma ovarico hanno evidenziato una significativa riduzione dell'espressione della COMT sia nel tessuto tumorale sia nel siero, associata a un aumento dei livelli di 17 β -estradiolo, soprattutto a livello tissutale. Di conseguenza la diminuzione dell'attività enzimatica potrebbe favorire l'accumulo di metaboliti estrogenici genotossici, contribuendo all'insorgenza e alla progressione della neoplasia (El-Etreby, 2021).

Un ulteriore ambito di interesse riguarda l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC), considerato una neoplasia estrogeno-dipendente nella quale il 2-metossiestradiolo sembrerebbe esercitare un effetto antitumorale. Studi immunoistochimici hanno evidenziato livelli di espressione di COMT più elevati nei campioni di PDAC rispetto al tessuto pancreatico normale e una correlazione inversa tra l'espressione dell'enzima e lo stadio patologico del tumore, con valori maggiori nei tumori in stadio T1-T2 rispetto a quelli in stadio T3-T4. Tali risultati suggeriscono un possibile valore prognostico

della COMT come biomarcatore prognostico del carcinoma pancreatico (Wu et al., 2012). Infine, alcuni studi di associazione genetica hanno evidenziato che i genotipi Val/Met (G/A) e Met/Met (A/A) del polimorfismo rs4680 potrebbero essere associati a un aumentato rischio di sviluppare il carcinoma polmonare, in particolare il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Una delle ipotesi proposte è che tale associazione derivi dall'interazione tra il metabolismo degli estrogeni e il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), considerato uno dei principali fattori coinvolti nello sviluppo del tumore del polmone dei soggetti non fumatori (Peng et al., 2015).

CAPITOLO 3. SCOPO DEL LAVORO

L'OTSCC rappresenta una delle neoplasie più aggressive del cavo orale ed è caratterizzato da un comportamento biologico estremamente eterogeneo. Nonostante i progressi nelle strategie diagnostiche e terapeutiche, la prognosi continua a dipendere in larga misura dalla capacità di identificare precocemente i pazienti a maggior rischio di recidiva e metastasi. I tradizionali parametri clinico-patologici, pur mantenendo un ruolo fondamentale nella stadiazione e nella definizione del trattamento, non sono sempre sufficienti a descrivere la reale aggressività biologica del tumore. Per tale motivo, negli ultimi anni la ricerca si è orientata verso l'identificazione di biomarcatori molecolari e morfologici in grado di migliorare la stratificazione prognostica.

Tra i biomarcatori di maggiore interesse figurano gli enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare e nei processi di metilazione, quali la NNMT e la COMT, la cui espressione è stata associata, in differenti neoplasie, ai processi di proliferazione, invasione e progressione tumorale. Parallelamente, specifici parametri istomorfometrici, quali il budding tumorale e la profondità di invasione, hanno dimostrato un importante valore prognostico nel carcinoma squamocellulare orale.

Lo scopo del presente studio è valutare il ruolo prognostico dell'espressione immunoistochimica di NNMT e COMT e dei principali parametri morfometrici in una coorte di pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della lingua sottoposti a trattamento chirurgico. In particolare, il lavoro si propone di analizzare le eventuali associazioni tra l'espressione dei biomarcatori e le caratteristiche clinico-patologiche della neoplasia, di valutarne la correlazione con gli outcome clinici. L'identificazione di marcatori affidabili potrebbe contribuire a definire percorsi diagnostico-terapeutici più personalizzati, favorendo una migliore selezione dei pazienti candidati a trattamenti più intensivi e a programmi di follow-up dedicati, con l'obiettivo finale di migliorare la gestione clinica e la prognosi dell'OTSCC.

CAPITOLO 4. MATERIALI E METODI

4.1 *Selezione dei casi clinici*

La coorte d'avvio considerata in questo studio di coorte retrospettivo era composta da pazienti della regione Marche affetti da OTSCC. I pazienti sono stati selezionati con modalità casuale dal database dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche (sistema ATHENA) nel periodo che va da giugno 2012 a settembre 2024. Tutti i pazienti sono stati trattati con intento curativo presso il Dipartimento di Chirurgia Maxillofacciale dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti" di Ancona. I dati clinici e patologici dei pazienti selezionati sono stati raccolti dagli archivi di entrambi i reparti.

I criteri d'inclusione per questo studio erano: (1) diagnosi definitiva di OTSCC primitivo (definito in base ai codici di diagnosi dell'International Classification of Disease-10: C02.0, C02.1, C02.2 e C02.3); (2) stadio patologico III e IV; (3) età dei pazienti maggiore di 18 anni; (4) un follow-up di almeno 3 anni per i pazienti vivi; (5) residenza nella regione Marche; (6) pazienti in stadio avanzato candidati alla radio-terapia.

I criteri d'esclusione erano: (1) carcinomi orali che coinvolgevano l'OT ed altri siti del cavo orale e per i quali non era possibile stabilire l'esatta sede anatomica d'origine del tumore; (2) recidive di OTSCC; (3) OTSCC secondi primitivi; (4) presenza di metastasi a distanza (M+); (5) pazienti sottoposti a radioterapia o chemioterapia preoperatorie; (6) positività all'infezione da virus del papilloma umano (Human Papilloma Virus, HPV) stabilita mediante le tecniche impiegate nella corrente pratica clinica (ibridazione fluorescente in situ specifica per HPV e colorazione immunoistochimica specifica per p16Ink4a); (7) pazienti trattati a scopo palliativo; (8) pazienti affetti da OTSCC con morte durante l'immediato decorso post-operatorio.

I dati clinico-patologici (l'età, il sesso, lo stadio patologico, il grado istologico e lo status dei margini di resezione) sono stati raccolti e catalogati da un singolo operatore per assicurarne l'uniformità. La stadiazione degli OTSCC è stata rivalutata da due operatori in base all'ottava edizione dell'AJCC.

4.2 Valutazione istopatologica

L'analisi istopatologica dei parametri morfologici è stata condotta da due esperti patologi orali, in cieco ai dati clinico-patologici, mediante microscopio ottico Olympus BM50 (Olympus, Tokyo, Japan), su sezioni seriali di 4 µm di spessore colorate con ematossilina-eosina, ricavate da blocchi fissati in formalina ed inclusi in paraffina contenente la parte più invasiva del tumore primario, ovvero quella utilizzata per la determinazione della profondità di invasione tumorale. Ogni disaccordo fra i due patologi è stato risolto mediante consenso unanime fra di essi.

Per ogni caso sono stati valutati e catalogati i seguenti parametri morfologici: grading, profondità d'invasione, spessore tumorale, invasione perineurale, invasione linfovascolare, estensione extranodale, margine chirurgico, infiltrazione neoplastica del tessuto osseo.

4.2.1. Grading

Grading del fronte infiltrativo secondo la 5° Edizione del WHO è stato classificato in: G1) OSCC ben differenziati, con grandi cellule organizzate in isole neoplastiche, ponti intercellulari, cellule discheratosiche prominenti e perle cornee; G2) OSCC moderatamente differenziati, caratterizzati da un pleomorfismo cellulare e nucleare più evidente, maggior prevalenza di mitosi, incluse quelle atipiche, e grado di cheratinizzazione ridotto; G3) OSCC scarsamente differenziati, con cellule neoplastiche organizzate a formare proiezioni digitiformi, piccole isole cellulari o cellule singole disperse nel fronte infiltrativo, scarsa o assente differenziazione squamosa, mitosi frequenti

(specialmente quelle atipiche) e ponti intercellulari appena distinguibili, con una quota significativa di stroma desmoplastico associato ad una risposta infiammatoria dell'ospite attorno ai nidi e/o alle cellule neoplastiche infiltranti (Figura 3);

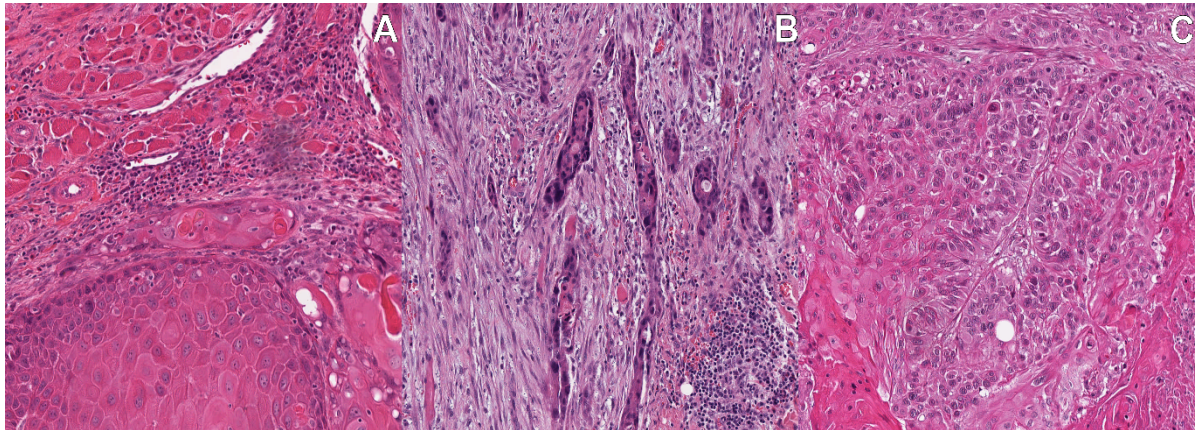


Figura 3. Rappresentazione microscopica del grado di differenziazione istologico prevalente del fronte infiltrativo di tre campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezioni colorate con ematossilina-eosina. A) OSCC ben differenziato; B) OSCC moderatamente differenziato; C) OSCC scarsamente differenziato.

4.2.2. Profondità d'invasione (P_DOI)

Secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) viene calcolata su campione chirurgico, in millimetri, mediante stampa di righelli su guide in acetato sovrapponibili alle sezioni istologiche, a partire dalla membrana basale della mucosa sana adiacente al tumore proseguendo per una linea perpendicolare che giunge fino al punto di massima infiltrazione neoplastica. In accordo con le linee guida vengono identificate tre categorie di rischio: neoplasie poco invasive ($DOI \leq 5$ mm), moderatamente invasive ($5 \text{ mm} < DOI \leq 10$ mm) e altamente invasive ($DOI > 10$ mm) (Figura 4);

4.2.3. Spessore tumorale (P_Td)

Rappresenta l'estensione totale della massa tumorale, variabile in base al pattern di crescita neoplastico (Figura 4);

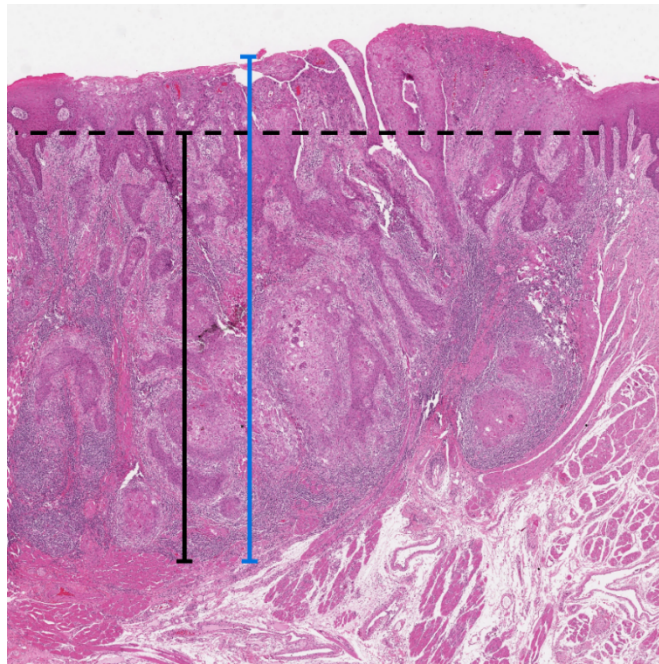


Figura 4. Rappresentazione istologica della misurazione della profondità di invasione e dello spessore tumorale in un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione colorata con ematossilina-eosina. Le linee colorate in nero definiscono il calcolo della profondità di invasione a partire dalla membrana basale della mucosa sana adiacente al tumore proseguendo perpendicolarmente fino al punto di massima infiltrazione neoplastica. La linea di colore blu definisce lo spessore tumorale più profondo.

4.2.4. Invasione perineurale (P_PNI)

Secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) la valutazione effettuata a basso ingrandimento (x4) ha permesso di discriminare la presenza di cellule tumorali all'interno di uno dei tre strati della guaina nervosa o in stretta prossimità di un nervo, coinvolto per almeno il 33% della

sua circonferenza, e di classificare l' invasione Perineurale in maniera dicotomica (presente/assente) e in focale (coinvolgimento di un singolo ramo nervoso in qualsiasi parte del campione) e multifocale (coinvolgimento di almeno 2 rami nervosi in qualsiasi parte del campione) (Figura 5);

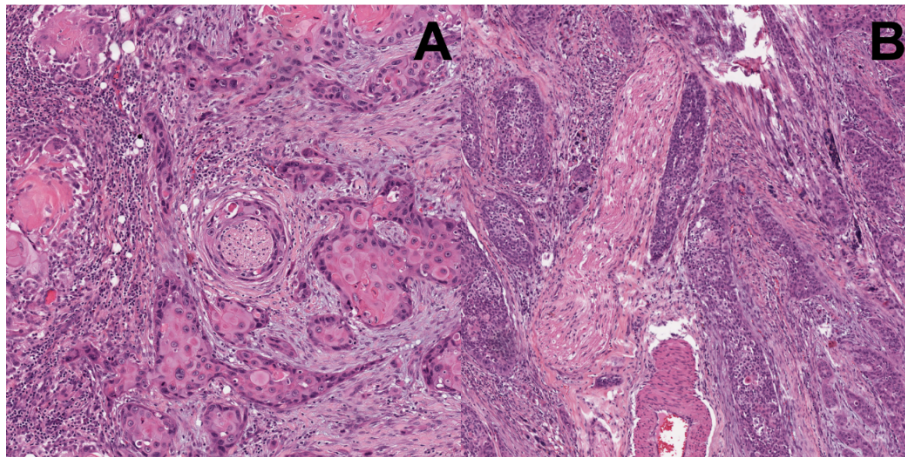


Figura 5. Rappresentazione istologica dell'invasione perineurale in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A) Fibra nervosa completamente invasa da cellule tumorali; B) Cellule tumorali in stretto contatto con un nervo, coinvolto per meno del 33% della sua circonferenza.

4.2.5. Invasione linfovaskolare (LVI)

Secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) è stata determinata, a basso ingrandimento (x4), la presenza di cellule o aggregati di cellule tumorali nella parete o nel lume di spazi rivestiti da endotelio (canali linfatici e/o sanguigni) e classificata in maniera dicotomica (presente od assente) (Figura 6);

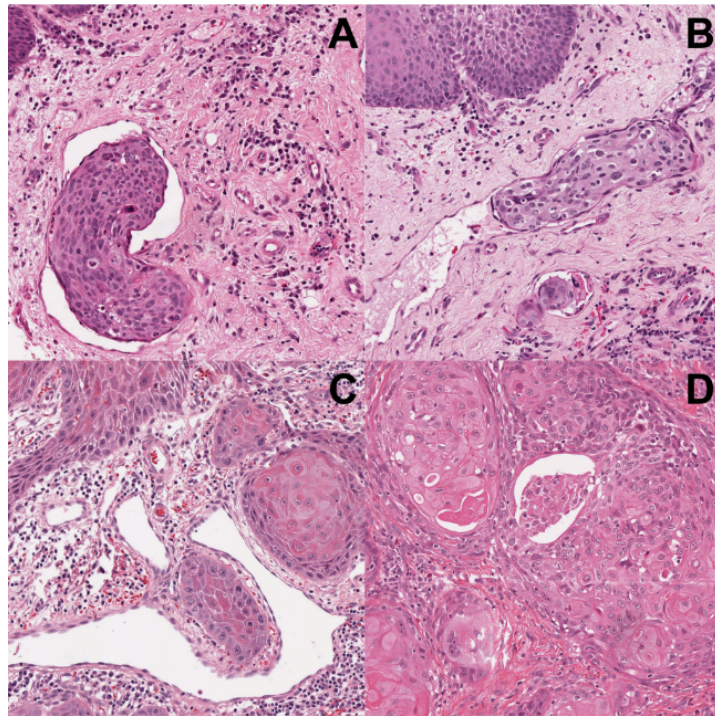


Figura 6. Raffigurazione istologica dell'invasione linfovaskolare in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina: A, B) Piccoli cluster di cellule tumorali sono localizzati all'interno di uno spazio vascolare; C) Cellule tumorali in vicinanza di un vaso senza che questo venga raggiunto; D) Artefatti da retrazione del tessuto tumorale.

4.2.6. Extranodal Extension (pENE)

Secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) la presenza di estensione extranodale del tumore metastatico è stata analizzata mediante l'analisi della capsula linfonodale macroscopicamente visibile o per mezzo della valutazione di un'estensione microscopica > 2 mm (ENE ma) e distinta come presente o assente (Figura 7).

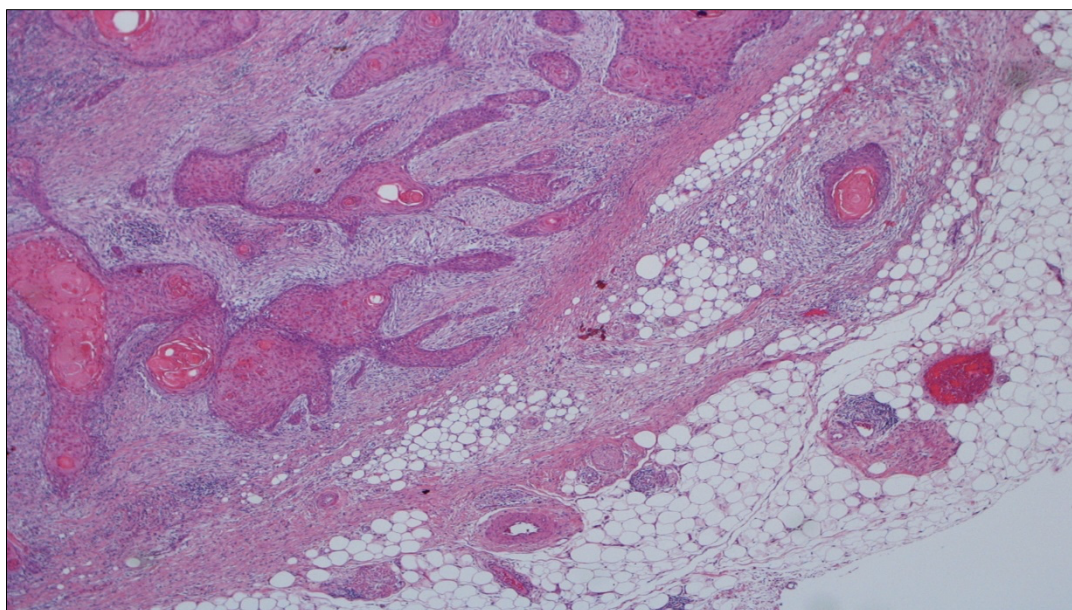


Figura 7. Rappresentazione istologica dell'estensione extranodale microscopica del tumore metastatico superiore a 2 mm (ENE (ma)) in un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina.

4.2.7. Margine chirurgico

Classificato secondo le linee guida del Royal College of Pathologists in “libero o negativo” se la distanza dal carcinoma invasivo risulta maggiore di 5 mm, “stretto” in presenza di carcinoma invasivo fra 1 e 5 mm dal margine neoplastico ed “positivo” in presenza di carcinoma invasivo entro 1 mm dal margine neoplastico o in presenza di displasia epiteliale moderata o severa (carcinoma in-situ) sul margine.

4.2.8. Infiltrazione neoplastica del tessuto muscolare (P_MM)

Ogni caso è stato valutato per la presenza o l'assenza di invasione muscolare, classificando il P_MM in maniera dicotomica.

4.2.9. Infiltrazione neoplastica del tessuto osseo (P_osso)

Ogni caso è stato valutato per la presenza o l'assenza di invasione del tessuto osseo, classificando il P_osso in maniera dicotomica.

4.3 Valutazione immunoistochimica

Il lavoro di ricerca ha impiegato sezioni seriali di 4 µm di tessuto, ottenute da blocchi fissati in formalina, inclusi in paraffina (FFPE), e successivamente montati su vetrini rivestiti di poli-L-lisina, come di routine. A seguire, i campioni sono stati deparaffinati, reidratati, incubati in una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo per 30 minuti, al fine di inattivare la perossidasi endogena, e riequilibrati per 20 minuti in PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X.

Per prevenire la formazione di legami aspecifici, le sezioni sono state pre-incubate per 30 minuti con siero equino non immune al 5% in PBS. I campioni sono stati infine incubati overnight a 4°C con anticorpi policlonali di coniglio anti-NNMT (Richard Weinshilboum, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), e anti-COMT (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany; Cat. No. C6870) diluiti in PBS 1X con un rapporto rispettivamente di 1:1500 e 1:2000. Dopo aver effettuato 3 lavaggi in PBS è stata eseguita, a temperatura ambiente per 30 minuti, l'incubazione sequenziale con anticorpi secondari biotinilati e streptoavidina marcata con la perossidasi (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Dopo 3 lavaggi in PBS, l'attività perossidasi è stata ottenuta mediante l'incubazione per 2 minuti con 0,1% di 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) come soluzione cromogena di substrato e 0,02% di perossido di idrogeno. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer per 3-5 minuti e l'immunoreattività è stata osservata al microscopio. In ogni fase è stato eseguito un controllo negativo sostituendo gli anticorpi primari con un reagente non immune (Dako diluente per anticorpi, Dakopatts, Amburgo, Germania). I controlli positivi consistevano in sezioni di tessuto epatico umano con reattività antigenica nota.

L'espressione dell'NNMT e della COMT è stata valutata a livello nucleare e citoplasmatico, nelle cellule epiteliali e stromali. Ne è stata quantificata l'estensione, tramite l'analisi di 100 cellule in 10 campi ad alto ingrandimento (HPF), stimando la percentuale di cellule positive sul numero totale di

cellule presenti, attribuendo i seguenti punteggi: Score 0: colorazione assente; Score 1: intensità di colorazione lieve; Score 2: intensità di colorazione moderata; Score 3: intensità di colorazione forte.

4.4 Analisi statistiche

Sono state condotte delle analisi statistiche volte a stabilire differenze significative nell'espressione dell'NNMT e della COMT nei carcinomi orali. Sono stato usati i software statistici GraphPad Prism versione 7.00 e SPSS versione 21.0 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA). È stata investigata la normalità della distribuzione delle variabili mediante i test di Shapiro-Wilk e di Kolgomorov-Smirnoff. È stato misurato l'indice di correlazione R per ranghi di Spearman allo scopo di valutare la presenza di una correlazione tra le caratteristiche clinico-patologiche e immunoistochimiche prese in esame. Si tratta di un'analisi statistica non parametrica che restituisce un valore, chiamato ρ di Spearman, capace di misurare il grado di relazione tra due variabili che siano ordinabili. Nel contesto dell'espressione immunoistochimica, le differenze esistenti tra i vari sottogruppi sono state stabilite mediante i test dei ranghi con segno di Wilcoxon per campioni appaiati, di Kruskal-Wallis e del chi quadrato (χ^2).

CAPITOLO 5. RISULTATI

5.1 *Caratteristiche cliniche e patologiche*

Il presente studio è stato condotto su una coorte di 100 campioni istologici relativi a pazienti affetti da OTSCC in stadi avanzati III e IV, di cui 37 di sesso femminile e 63 di sesso maschile, in un rapporto maschi/femmine pari a 1,68:1. L'età media della popolazione studiata è di 68,3 anni (deviazione standard pari a $\pm 11,6$) con un range compreso fra 39 e 76 anni di età. Nelle donne l'età media è pari a 72,4 anni (deviazione standard $\pm 11,1$; range fra 40 e 88 anni di età), mentre negli uomini l'età media è pari a 66,05 anni (deviazione standard $\pm 11,5$; range compreso fra 39 e 89 anni di età).

La dimensione massima radiologica del tumore presenta un valore medio di 3,7 cm (deviazione standard $\pm 1,4$; range compreso fra 1,2 e 7 cm). Con riferimento alla profondità di invasione clinica (DOI), è stato riscontrato un valore medio di 1,44 cm (deviazione standard $\pm 0,8$) mentre per lo spessore tumorale clinico (Tumor Depth) il valore medio si attesta a 2,18 cm (deviazione standard $\pm 1,32$). L'interessamento linfonodale clinico-radiologico è stato riscontrato in 28 casi. Tra i casi con positività linfonodale, il numero medio di linfonodi metastatici era pari a 2,9 (deviazione standard $\pm 1,80$). L'analisi clinica-radiologica ha inoltre evidenziato coinvolgimento muscolare in 25 pazienti, infiltrazione ossea in 20 pazienti, estensione perineurale (PNS) in 12 pazienti ed estensione extracapsulare linfonodale (ENE) in un caso soltanto. L'analisi istopatologica dei pezzi operatori ha evidenziato margini di resezione positivi in 36 pazienti.

Considerando il grading istologico, un caso è stato classificato come G1, 51 casi come G2, 45 casi come G3 e tre casi non definiti. Seguendo la stadiazione secondo AJCC, 35 pazienti sono risultati in stadio III e 65 pazienti in stadio IV. L'invasione perineurale (Perineural Invasion, PNI) è stata riscontrata in 62 casi, di cui, PNI unifocale in 30 casi (48,4%) e PNI multifocale in 32 casi (51,6%). L'invasione linfovaskolare (Lymphovascular Invasion, LVI) è stata invece riscontrata in 16 casi. La dimensione patologica massima del tumore era pari in media a 3,5 cm (deviazione standard $\pm 1,6$;

range tra 1,2 e 10 cm), mentre il Tumor Depth istopatologico presentava un valore medio di 1,29 cm (deviazione standard $\pm 0,54$). L'estensione extracapsulare linfonodale patologica (ENE) è stata osservata in un 6% dei casi mentre quella muscolare ed ossea rispettivamente in un 74,4% e in un 30,4% dei casi.

5.2 *Analisi di correlazione*

Dall'analisi di correlazione R per ranghi di Sperman si evidenzia la sussistenza di correlazioni positive, statisticamente significative, tra i diversi parametri sia istopatologici (Tabella 6) che radiologici (Tabella 7).

5.2.1. *Correlazione tra i parametri istopatologici*

Risulta una correlazione positiva significativa tra NNMT e TD ($\rho=0,216$, $P=0,031$) e NNMT e invasione ossea ($\rho=0,198$, $P=0,049$). Allo stesso modo si è evidenziata una correlazione positiva significativa fra età e sesso ($\rho=0,262$, $P=0,008$) così come fra $\varnothing$ max ed ENE ($\rho=0,227$, $P=0,023$) e $\varnothing$ max e T ($\rho=0,232$, $P=0,020$). In maniera simile risulta una correlazione positiva significativa anche fra l'invasione muscolare e l'ENE ($\rho=0,219$, $P=0,028$). Infine è stata evidenziata una correlazione positiva significativa fra T e stadio ($\rho=0,436$, $P=0,000$) e N e stadio ($\rho=0,616$, $P=0,000$).

5.2.2. *Correlazione tra i parametri radiologici*

Risulta esserci una correlazione positiva significativa tra NNMT e PNS ($\rho=0,390$, $P=0,011$) e tra NNMT e invasione ossea ($\rho=0,470$, $P=0,002$). Anche fra età e sesso risulta esserci una correlazione positiva significativa ($\rho=0,262$, $P=0,008$), così come fra sesso e $\varnothing$ max ($\rho=0,352$, $P=0,022$), sesso e TD ($\rho=0,426$, $P=0,006$) e sesso e DOI ($\rho=0,384$, $P=0,013$). Il $\varnothing$ max si è evidenziato avere una

correlazione statisticamente significativa con TD ($\rho=0,848$, $P=0,000$), con DOI ($\rho=0,689$, $P=0,000$) e con l'invasione muscolare ($\rho=0,581$, $P=0,000$). Risultano essere positive statisticamente le correlazioni fra TD e DOI ($\rho=0,818$, $P=0,000$) e TD e invasione muscolare ($\rho=0,491$ e $P=0,001$). Anche fra DOI e l'invasione muscolare risulta esserci una correlazione positiva significativa ($\rho=0,488$, $P=0,001$) così come fra PNS e invasione ossea ($\rho=0,663$, $P=0,000$), PNS e T ($\rho=0,339$, $P=0,028$) e PNS e stadio tumorale ($\rho=0,377$, $P=0,014$). Si è evidenziata una correlazione positiva significativa tra invasione ossea e T ($\rho=0,473$, $P=0,002$). Risultano essere positive statisticamente anche le correlazioni fra T e stadio tumorale ($\rho=0,436$, $P=0,000$) ed N e stadio tumorale ($\rho=0,616$, $P=0,000$).

Tabella 6. Correlazione R per ranghi di Spearman per le caratteristiche clinico-patologiche prese in esame. In grassetto sono evidenziate le correlazioni statisticamente significative. G=grading; Dmax=diametro massimo; TD=tumor depth; PNI=invasione perineurale; MM=invasione muscolare; ENE=estensione extranodale; T=spessore del tumore primitivo; N=metastasi linfonodali loco-regionali.

	COMT	NNMT	Età	Sesso	G	Dmax	TD	PNI	MM	Osso	ENE	T	N	Stadio
COMT	ρ = 1	-0,156	0,076	-0,128	-0,105	0,006	-0,085	-0,044	-0,113	0,077	-0,068	0,077	-0,091	-0,061
	P = 1	0,121	0,451	0,203	0,300	0,950	0,402	0,663	0,263	0,447	0,502	0,444	0,368	0,545
NNMT	ρ = 1	-0,001	0,034	-0,062	-0,047	0,216	0,035	0,050	0,198	-0,106	0,126	0,005	0,148	
	P = 1	0,993	0,740	0,542	0,642	0,031	0,730	0,618	0,049	0,294	0,212	0,963	0,141	
Età	ρ = 1		0,262	-0,093	0,046	-0,144	0,019	-0,060	0,098	0,069	0,005	0,056	-0,008	
	P = 1		0,008	0,355	0,647	0,153	0,854	0,554	0,333	0,493	0,964	0,577	0,940	
Sesso	ρ = 1			0,142	0,185	0,031	0,062	0,171	0,037	0,019	0,113	-0,029	0,002	
	P = 1			0,157	0,066	0,763	0,539	0,089	0,713	0,850	0,263	0,773	0,983	
G	ρ = 1				0,047	0,139	0,179	0,085	0,000	0,032	0,055	0,062	-0,051	
	P = 1				0,641	0,168	0,075	0,403	0,997	0,749	0,588	0,540	0,612	
Dmax	ρ = 1					-0,154	0,044	-0,073	0,104	0,227	0,232	-0,032	0,021	
	P = 1					0,125	0,667	0,469	0,302	0,023	0,020	0,751	0,832	
TD	ρ = 1						0,036	0,144	0,112	0,133	-0,058	0,113	0,117	
	P = 1						0,720	0,153	0,265	0,187	0,569	0,262	0,245	
PNI	ρ = 1							0,016	-0,096	0,004	0,061	0,029	-0,084	
	P = 1							0,873	0,342	0,972	0,544	0,772	0,406	
MM	ρ = 1								-0,054	0,219	-0,064	0,047	0,083	
	P = 1								0,596	0,028	0,527	0,640	0,414	
Osso	ρ = 1									0,188	0,094	-0,061	0,144	
	P = 1									0,061	0,350	0,547	0,153	
ENE	ρ = 1										0,131	-0,056	0,097	
	P = 1										0,194	0,583	0,336	
T	ρ = 1											-0,103	0,436	
	P = 1											0,307	0,000	
N	ρ = 1												0,616	
	P = 1												0,000	
Stadio	ρ = 1													ρ = 1
	P = 1													P = 1

Tabella 7. Correlazione R per ranghi di Spearman per le caratteristiche radiologiche prese in esame. In grassetto sono evidenziate le correlazioni statisticamente significative. Dmax-R=diametro massimo radiologico; TD-R=Tumor Depth radiologico; PNS-R=perineural spread radiologico; MM-R=invasione muscolare radiologica; ENE-R=estensione extranodale radiologica; T=spessore del tumore primitivo; N=metastasi linfonodali loco-regionali.

	COMT	NNMT	Età	Sesso	Dmax-R	TD-R	DOI-R	PNS-R	MM-R	Osso-R	ENE-R	T	N	Stadio
COMT	$\rho = 1$ P = 1	-0,156 0,121	0,076 0,451	-0,128 0,203	0,209 0,185	-0,017 0,916	-0,062 0,702	0,238 0,129	0,000 1,000	0,109 0,492	-0,114 0,473	0,077 0,444	-0,091 0,368	-0,061 0,545
NNMT		$\rho = 1$ P = 1	-0,001 0,993	0,034 0,740	0,099 0,533	0,022 0,894	0,060 0,710	0,390 0,011	-0,200 0,203	0,470 0,002	-0,229 0,145	0,126 0,212	0,005 0,963	0,148 0,141
Età			$\rho = 1$ P = 1	0,262 0,008	-0,069 0,666	-0,074 0,649	-0,083 0,608	-0,004 0,978	-0,124 0,433	0,112 0,479	-0,245 0,118	0,005 0,964	0,056 0,577	-0,008 0,940
Sesso				$\rho = 1$ P = 1	0,352 0,022	0,426 0,006	0,384 0,013	0,073 0,644	0,160 0,310	0,033 0,835	0,082 0,608	0,113 0,263	-0,029 0,773	0,002 0,983
Dmax-R					$\rho = 1$ P = 1	0,848 0,000	0,689 0,000	0,187 0,235	0,581 0,000	0,108 0,495	0,155 0,328	0,223 0,156	0,010 0,948	-0,121 0,446
TD-R						$\rho = 1$ P = 1	0,818 0,000	0,240 0,135	0,491 0,001	0,221 0,170	0,250 0,120	0,263 0,100	0,064 0,693	-0,040 0,806
DOI-R							$\rho = 1$ P = 1	0,221 0,164	0,488 0,001	0,145 0,366	-0,040 0,803	0,249 0,117	0,117 0,465	0,019 0,908
PNS-R								$\rho = 1$ P = 1	0,092 0,562	0,663 0,000	-0,099 0,534	0,339 0,028	-0,127 0,423	0,377 0,014
MM-R									$\rho = 1$ P = 1	-0,088 0,580	0,129 0,416	-0,004 0,979	0,037 0,817	-0,160 0,311
Osso-R										$\rho = 1$ P = 1	0,164 0,300	0,473 0,002	-0,206 0,190	0,243 0,122
ENE-R											$\rho = 1$ P = 1	-0,055 0,729	-0,056 0,726	-0,262 0,093
T												$\rho = 1$ P = 1	-0,103 0,307	0,436 0,000
N													$\rho = 1$ P = 1	0,616 0,000
Stadio														$\rho = 1$ P = 1

5.3 *Analisi istopatologica dei biomarcatori*

Sono state eseguite delle analisi istopatologiche dei biomarcatori per evidenziarne la correlazione ed il rapporto di essi con alcune delle caratteristiche clinico-radiologiche di aggressività tumorale.

5.3.1. *Livelli di espressione immunoistochimica*

Per quanto riguarda l'espressione dei due biomarcatori nei pazienti affetti da OSCC, i livelli di espressione di NNMT sono significativamente maggiori rispetto a quelli di COMT ($P=0,0217$) (Figura 3).

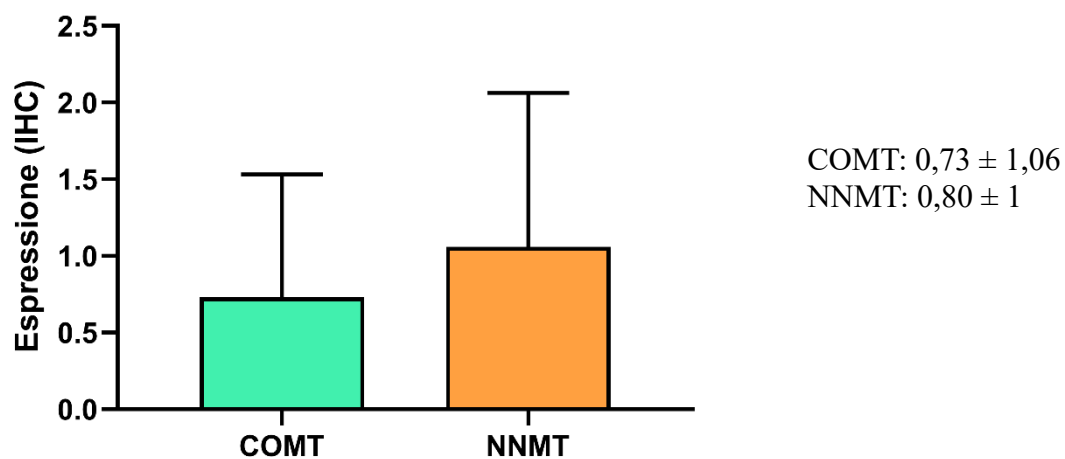


Figura 3. Comparazione dei livelli di espressione medi tra COMT e NNMT.

Inoltre, emerge una tendenza di espressione inversa tra i livelli della COMT e quella della NNMT. In particolare, all'aumentare del valore medio di espressione di NNMT si nota una riduzione del valore medio di espressione di COMT, particolarmente evidente nei valori estremi ($P = 0,009$) (Figura 4).

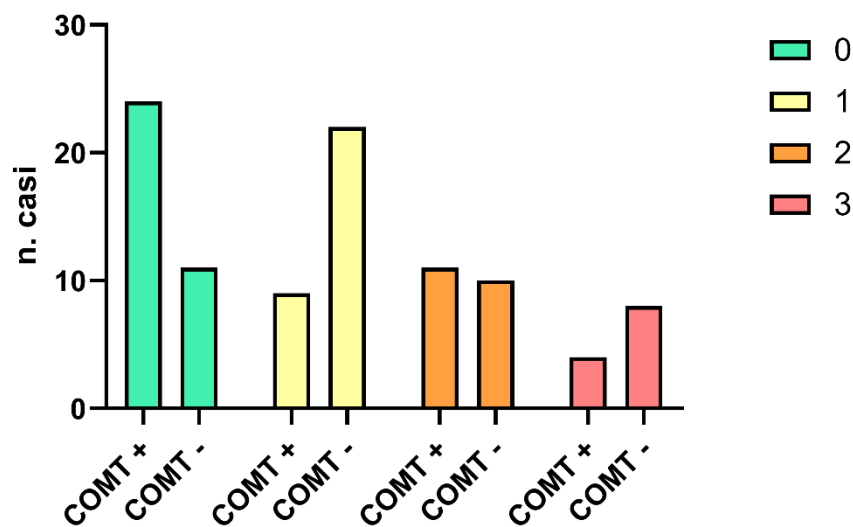


Figura 4. Associazione inversa tra i livelli di espressione media di COMT e NNMT

5.3.2. *Correlazione tra NNMT e parametri istopatologici*

Analizzando la correlazione fra NNMT ed invasione ossea, si è osservato che un'aumentata espressione di NNMT si associa più frequentemente all'invasione microscopica del tessuto osseo da parte del tumore ($P = 0,0019$) (Figura 5).

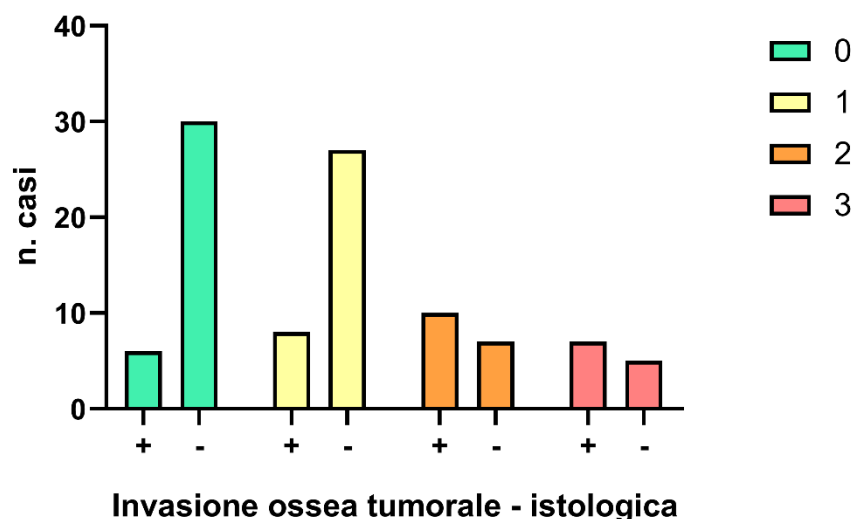


Figura 5. Correlazione fra NNMT e invasione ossea istologica

Allo stesso modo è presente una forte correlazione anche fra NNMT e Tumor Depth (TD). In particolar modo si evince che ad una maggiore espressione di NNMT corrispondono valori più elevati di TD.

In particolar modo sono emersi i seguenti valori: NNMT-0 (negativo): $1,07 \pm 0,39$; NNMT-1 (positività scarsa): $1,20 \pm 0,51$; NNMT-2 (positività media): $1,31 \pm 0,44$; NNMT-3 (positività alta): $1,52 \pm 0,49$.

Tale tendenza ha dimostrato di essere statisticamente significativa tra i valori di NNMT-0 e NNMT-3 ($P = 0,0117$). Ciò evidenzia che all'aumentare dell'espressione di NNMT aumenta la profondità raggiunta dal tumore (Figura 6).

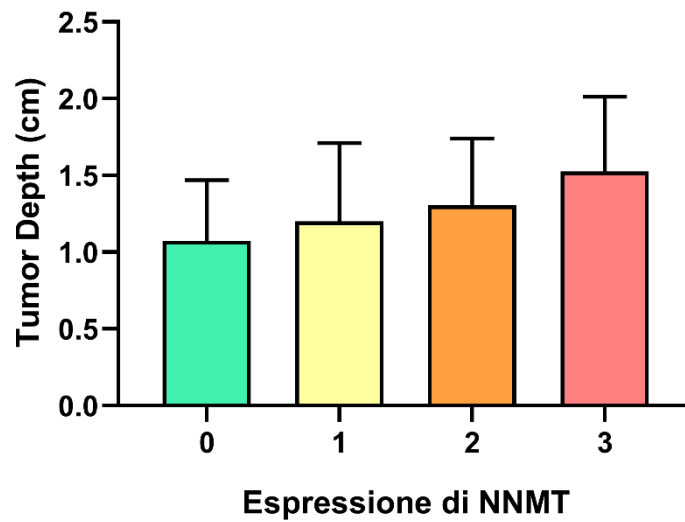


Figura 6. Correlazione fra NNMT e Tumor Depth

5.3.3. Correlazione tra NNMT e parametri radiologici

A livello radiologico si è osservata una correlazione positiva significativa fra NNMT ed invasione ossea. In particolare, un'aumentata espressione di NNMT si associa più frequentemente all'invasione macroscopica del tessuto osseo da parte del tumore ($P = 0,0007$) (Figura 7).

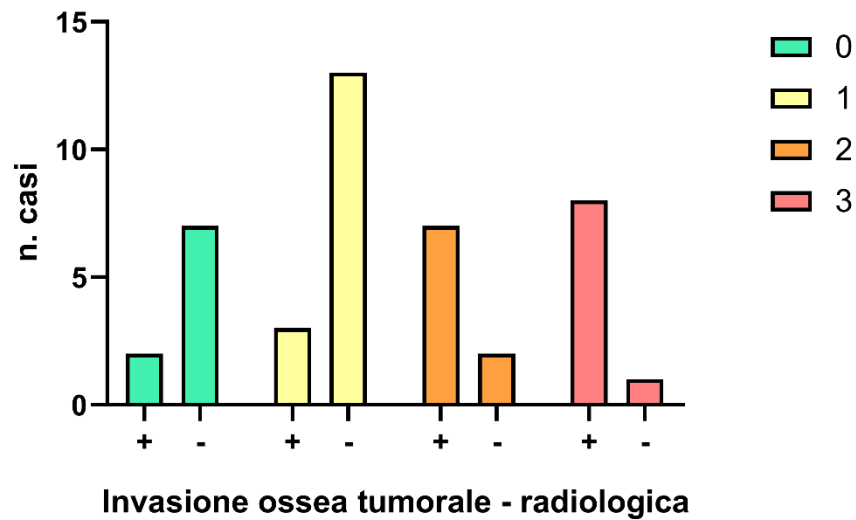


Figura 7. Correlazione fra NNMT e invasione ossea radiologica

Infine, un'aumentata espressione di NNMT si associa più frequentemente all'invasione macroscopica delle fibre nervose da parte del tumore (PNS) ($P = 0,0181$) (Figura 8).

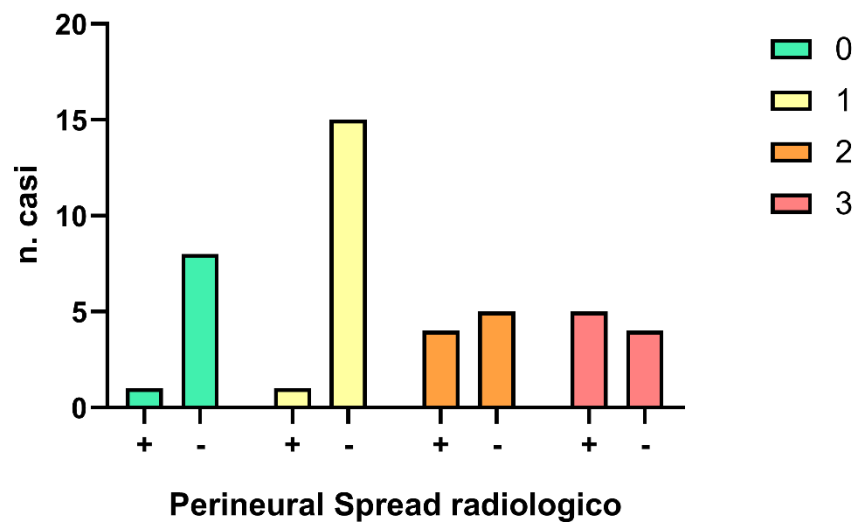


Figura 8. Correlazione fra NNMT e Perineural Spread radiologico

CAPITOLO 6. DISCUSSIONE

Il carcinoma squamocellulare della lingua rappresenta una delle neoplasie più aggressive del distretto testa-collo e continua a essere gravato da un'elevata incidenza di recidive loco-regionali e da una prognosi sfavorevole negli stadi avanzati. Nonostante i progressi ottenuti nella diagnostica, nella stadiazione e nel trattamento chirurgico e oncologico, la sopravvivenza dei pazienti dipende ancora in larga misura dalla capacità di identificare precocemente quei tumori caratterizzati da un comportamento biologico maggiormente aggressivo. In questo contesto, la ricerca di nuovi biomarcatori prognostici rappresenta uno degli ambiti di maggiore interesse della moderna oncologia, con l'obiettivo di integrare i tradizionali parametri clinico-patologici e migliorare la stratificazione prognostica dei pazienti (Howlader et al., 2019). Negli ultimi anni è emerso come il comportamento biologico dell'OTSCC non dipenda esclusivamente dalle caratteristiche morfologiche del tumore stesso, ma anche da profonde alterazioni metaboliche che consentono alle cellule neoplastiche di sostenere la proliferazione, l'invasione dei tessuti circostanti e la diffusione metastatica. Tra queste alterazioni, la nicotinamide N-metiltransferasi e la catecolo-O-metiltransferasi svolgono un ruolo centrale poiché entrambi gli enzimi partecipano a reazioni di metilazione dipendenti dalla S-adenosilmetionina intervenendo su substrati differenti e coinvolgendo meccanismi biologici differenti, che possono influenzare il fenotipo tumorale (Jancova et al., 2010; Bonifacio et al., 2007). Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'espressione immunoistochimica di NNMT e COMT in una coorte di pazienti affetti da OTSCC e di analizzarne la possibile associazione con i principali parametri clinico-radiologici di aggressività tumorale. L'obiettivo finale è stato quello di verificare se tali biomarcatori possano contribuire ad una migliore caratterizzazione biologica della neoplasia e, in prospettiva, rappresentare un utile supporto nella definizione della prognosi. I primi risultati emersi sono quelli derivanti dallo studio di correlazioni sussistenti tra NNMT ed alcuni parametri istopatologici, oltre che tra i diversi parametri istopatologici stessi; al contrario la COMT non ha dimostrato di avere alcun tipo di correlazione con tali parametri. Risulta una

correlazione positiva significativa tra NNMT e TD ($\rho=0,216$, $P=0,031$) e NNMT e invasione ossea ($\rho=0,198$, $P=0,049$). Allo stesso modo si è evidenziata una correlazione positiva significativa fra età e sesso ($\rho=0,262$, $P=0,008$) così come fra $\varnothing$ max ed ENE ($\rho=0,227$, $P=0,023$) e $\varnothing$ max e T ($\rho=0,232$, $P=0,020$). In maniera simile risulta una correlazione positiva significativa anche fra l'invasione muscolare e l'ENE ($\rho=0,219$, $P=0,028$). Infine è stata evidenziata una correlazione positiva significativa fra T e stadio ($\rho=0,436$, $P=0,000$) e N e stadio ($\rho=0,616$, $P=0,000$).

Allo stesso modo si sono studiati anche le correlazioni sussistenti tra NNMT e i parametri radiologici e tra i parametri radiologici stessi. Risulta esserci una correlazione positiva significativa tra NNMT e PNS ($\rho=0,390$, $P=0,011$) e tra NNMT e invasione ossea ($\rho=0,470$, $P=0,002$). Anche fra età e sesso risulta esserci una correlazione positiva significativa ($\rho=0,262$, $P=0,008$), così come fra sesso e $\varnothing$ max ($\rho=0,352$, $P=0,022$), sesso e TD ($\rho=0,426$, $P=0,006$) e sesso e DOI ($\rho=0,384$, $P=0,013$). Il $\varnothing$ max si è evidenziato avere una correlazione statisticamente significativa con TD ($\rho=0,848$, $P=0,000$), con DOI ($\rho=0,689$, $P=0,000$) e con l'invasione muscolare ($\rho=0,581$, $P=0,000$). Risultano essere positive statisticamente le correlazioni fra TD e DOI ($\rho=0,818$, $P=0,000$) e TD e invasione muscolare ($\rho=0,491$ e $P=0,001$). Anche fra DOI e l'invasione muscolare risulta esserci una correlazione positiva significativa ($\rho=0,488$, $P=0,001$) così come fra PNS e invasione ossea ($\rho=0,663$, $P=0,000$), PNS e T ($\rho=0,339$, $P=0,028$) e PNS e stadio tumorale ($\rho=0,377$, $P=0,014$). Si è evidenziata una correlazione positiva significativa tra invasione ossea e T ($\rho=0,473$, $P=0,002$). Risultano essere positive statisticamente anche le correlazioni fra T e stadio tumorale ($\rho=0,436$, $P=0,000$) ed N e stadio tumorale ($\rho=0,616$, $P=0,000$).

Per quanto riguarda l'espressione dei due biomarcatori nei pazienti affetti da OSCC, i livelli di espressione di NNMT sono risultati significativamente maggiori rispetto a quelli di COMT ($P=0,0217$). Ancora più interessante è l'osservazione di una correlazione inversa tra i due enzimi: all'aumentare dell'espressione di NNMT si assiste infatti ad una progressiva riduzione dei livelli di COMT, relazione che raggiunge la significatività statistica. Inoltre, l'aumentata espressione di NNMT risulta significativamente associata più frequentemente alla presenza di invasione ossea microscopica

($P = 0,0019$) e a valori più elevati di Tumor Depth, suggerendo un possibile coinvolgimento dell'enzima nei processi di progressione locale del carcinoma. A livello radiologico un'aumentata espressione di NNMT si associa più frequentemente all'invasione macroscopica del tessuto osseo da parte del tumore ($P = 0,0007$), suggerendo una correlazione positiva fra i due parametri. Infine, un'aumentata espressione di NNMT si associa più frequentemente all'invasione macroscopica delle fibre nervose da parte del tumore (PNS) ($P = 0,0181$).

L'interpretazione dei risultati ottenuti richiede una valutazione dei principali meccanismi molecolari attraverso i quali NNMT e COMT possono influenzare il comportamento biologico del carcinoma squamocellulare della lingua. Negli ultimi anni la NNMT è passata dall'essere considerata un semplice enzima del metabolismo della nicotinamide ad essere riconosciuta come un importante regolatore del metabolismo cellulare e dell'assetto epigenetico. L'elevata attività enzimatica determina infatti un consumo di S-adenosil-L-metionina (SAM), principale donatore di gruppi metilici, con conseguente riduzione del potenziale metilante intracellulare e modificazioni dell'espressione genica (Ulanovskaya et al., 2013)

La diminuzione della disponibilità di SAM favorisce uno stato di ipometilazione degli istoni e altera la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nella migrazione e nell'invasione. Questo fenomeno rappresenta uno dei principali collegamenti tra metabolismo ed epigenetica ed è stato descritto in diverse neoplasie solide. Nell'OTSCC tali alterazioni potrebbero contribuire all'acquisizione di un fenotipo maggiormente aggressivo, coerentemente con l'associazione osservata nel presente studio tra elevata espressione di NNMT e parametri istopatologici sfavorevoli come grading, profondità d'invasione, spessore tumorale, invasione perineurale, invasione linfovaskolare, estensione extranodale, margine chirurgico, infiltrazione neoplastica del tessuto tumorale ed infiltrazione neoplastica del tessuto osseo (Ulanovskaya et al., 2013; Yu et al., 2015).

Un ulteriore aspetto riguarda il possibile coinvolgimento della NNMT nella transizione epiteliomesenchimale (EMT), processo biologico mediante il quale le cellule epiteliali acquisiscono

caratteristiche migratorie e invasive. Studi sperimentali hanno dimostrato che la sovraespressione dell'enzima può modulare vie di segnalazione come PI3K/AKT, favorendo la degradazione della matrice extracellulare e aumentando la capacità infiltrativa delle cellule tumorali. Inoltre, è stata descritta un'associazione tra NNMT e cellule staminali tumorali, popolazioni responsabili della progressione della malattia, della formazione di metastasi e della chemioresistenza (Tao et al., 2015). Per quanto riguarda COMT, il suo ruolo appare probabilmente complementare. L'enzima interviene nella detossificazione dei metaboliti catecolici e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi ossidativa. Una riduzione della sua attività potrebbe determinare un aumento dello stress ossidativo e dell'instabilità genomica, creando un microambiente favorevole alla progressione tumorale. Sebbene tali meccanismi debbano essere ulteriormente confermati nell'OTSCC, la correlazione inversa osservata con NNMT suggerisce l'esistenza di una profonda riprogrammazione metabolica durante l'evoluzione della neoplasia. (Zhang et al., 2022)

Nel complesso, i dati disponibili supportano l'ipotesi che NNMT non rappresenti soltanto un biomarcatore prognostico, ma possa costituire anche un potenziale bersaglio terapeutico. Lo sviluppo di inibitori selettivi dell'enzima o di strategie capaci di modulare il metabolismo dei gruppi metilici potrebbe, in futuro, affiancare i trattamenti convenzionali contribuendo a limitare la progressione tumorale e a migliorare la risposta alle terapie sistemiche nei pazienti affetti da carcinoma squamocellulare della lingua (Maloney et al., 2026).

Sebbene i risultati ottenuti supportino un possibile ruolo prognostico dell'NNMT e, in misura minore, della COMT nell'OTSCC, essi devono essere interpretati considerando alcuni limiti metodologici. In primo luogo, la numerosità della casistica potrebbe aver ridotto la potenza statistica nell'identificazione di associazioni significative con alcuni parametri clinico-patologici. Inoltre, la natura retrospettiva dello studio non consente di stabilire relazioni causali tra l'espressione dei biomarcatori e la progressione della malattia.

Un ulteriore limite riguarda l'impiego della sola valutazione immunoistochimica. Sebbene tale metodica rappresenti uno strumento affidabile e facilmente trasferibile nella pratica diagnostica,

l'integrazione con analisi molecolari, quali Real-Time PCR, Western blot o studi di trascrittomica e proteomica, consentirebbe una caratterizzazione più completa dei meccanismi biologici coinvolti. Analogamente, esperimenti funzionali su linee cellulari e modelli animali permetterebbero di chiarire il ruolo causale di NNMT e COMT nella proliferazione, nella migrazione e nell'invasione cellulare. Nonostante tali limitazioni, il presente studio presenta importanti punti di forza. La valutazione contemporanea di NNMT e COMT nello stesso gruppo di pazienti costituisce infatti un approccio ancora poco esplorato nella letteratura relativa all'OTSCC. L'associazione osservata tra elevata espressione di NNMT e parametri di aggressività tumorale, unitamente alla correlazione inversa con COMT, suggerisce che l'analisi combinata dei due biomarcatori possa migliorare la stratificazione prognostica rispetto all'utilizzo dei soli parametri istopatologici convenzionali.

Dal punto di vista clinico, questi risultati potrebbero aprire prospettive interessanti nell'ambito della medicina personalizzata. In futuro, l'integrazione dell'espressione immunoistochimica di NNMT con variabili consolidate quali Depth of Invasion (DOI), pattern d'invasione, stato linfonodale ed estensione extranodale potrebbe contribuire all'identificazione dei pazienti a maggior rischio di recidiva, orientando sia la pianificazione chirurgica sia l'intensità del follow-up. Parallelamente, lo sviluppo di inibitori selettivi della NNMT potrebbe offrire nuove opportunità terapeutiche qualora il ruolo funzionale dell'enzima venisse definitivamente confermato.

In conclusione, i risultati ottenuti rafforzano l'ipotesi che NNMT rappresenti un promettente biomarcatore prognostico nell'OTSCC e suggeriscono un possibile coinvolgimento della COMT nella riprogrammazione metabolica della neoplasia. Saranno tuttavia necessari studi prospettici multicentrici, condotti su casistiche più ampie e integrati con approfondimenti molecolari e funzionali, per confermare tali evidenze e valutarne l'applicabilità nella pratica clinica. L'identificazione di nuovi biomarcatori metabolici potrà contribuire, in futuro, a una migliore comprensione della biologia dell'OTSCC e allo sviluppo di strategie diagnostiche e terapeutiche sempre più personalizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Ghanem, S., et al., Elective Neck Dissection vs Observation in Early-Stage Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue With No Clinically Apparent Lymph Node Metastasis in the Neck: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016. 142(9): p. 857-65.
2. Akintoye, S.O. and M. Mupparapu, Clinical Evaluation and Anatomic Variation of the Oral Cavity. *Dermatol Clin*, 2020. 38(4): p. 399-411.
3. Aksoy S, Brandriff BF, Ward A, Little PF, Weinshilboum RM. Human nicotinamide N-methyltransferase gene: molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization. *Genomics*. 1995 Oct 10;29(3):555-61.
4. Aksoy S, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*. 1994 May 20;269(20):14835-40.
5. Alkhabuli, J.O. and A.S. High, Significance of eosinophil counting in tumor associated tissue eosinophilia (TATE). *Oral Oncol*, 2006. 42(8): p. 849-50.
6. Amin, M.B., S.B. Edge, and American Joint Committee on Cancer., *AJCC cancer staging manual*. Eighth edition / ed. 2017, Switzerland: Springer. xvii, 1024 pages.
7. Amin, M.B., S.B. Edge, and American Joint Committee on Cancer., *AJCC cancer staging manual*. Eighth edition / ed. 2017, Switzerland: Springer. xvii, 1024 pages.
8. Amsterdam, J.T. and J.G. Strawitz, Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults. *J Surg Oncol*, 1982. 19(2): p. 65-8.
9. Ansarin, M., et al., Classification of GLOSSECTOMIES: Proposal for tongue cancer resections. *Head Neck*, 2019. 41(3): p. 821-827.
10. Arya, S., D. Chaukar, and P. Pai, Imaging in oral cancers. *Indian J Radiol Imaging*, 2012. 22(3): p. 195-208.

11. Bagan, J., G. Sarrion, and Y. Jimenez, Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*, 2010. 46(6): p. 414-7.
12. Bagnardi, V., et al., A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*, 2001. 85(11): p. 1700-5.
13. Bassler, R., Histopathology of different types of atrophy of the human tongue. *Pathol Res Pract*, 1987. 182(1): p. 87-97.
14. Batra, V., et al., The genetic determinants of smoking. *Chest*, 2003. 123(5): p. 1730-9.
15. Boffetta, P. and M. Hashibe, Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*, 2006. 7(2): p. 149-56.
16. Bonifácio, M.J., Palma, P.N., Almeida, L., Soares-da-Silva, P. (2007). Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. *CNS drug reviews*, 13(3), 352-379.
17. Booth ES, Basran J, Lee M, Handa S, Raven EL. Substrate Oxidation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase: EVIDENCE FOR A COMMON REACTION MECHANISM. *J Biol Chem*. 2015 Dec 25;290(52):30924-30. Epub 2015 Oct 28.
18. Byers, R.M., Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. *Am J Surg*, 1975. 130(4): p. 475-8.
19. Cai, X. and J. Huang, Distant metastases in newly diagnosed tongue squamous cell carcinoma. *Oral Dis*, 2019. 25(7): p. 1822-1828.
20. Calabrese, L., et al., Compartmental tongue surgery: Long term oncologic results in the treatment of tongue cancer. *Oral Oncol*, 2011. 47(3): p. 174-9.
21. Calabrese, L., et al., From Bench to Bedside in Tongue Muscle Cancer Invasion and Back again: Gross Anatomy, Microanatomy, Surgical Treatments and Basic Research. *Life (Basel)*, 2020. 10(9).
22. Campbell, B.R., et al., Early onset oral tongue cancer in the United States: A literature review. *Oral Oncol*, 2018. 87: p. 1-7.
23. Cancer incidence in five continents. Volume V. IARC Sci Publ, 1987(88): p. 1-970.

24. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD (+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* 2015 Jul 7;22(1):31-53.
25. Carta, A., Pavanello, S., Mastrangelo, G., Fedeli, U., Arici, C., Porru, S. (2018). Impact of occupational exposures and genetic polymorphisms on recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer. *International journal of environmental research and public health*, 15(8), 1563.
26. Castellsague, X., et al., The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2004. 108(5): p. 741-9.
27. Chen C, Wang X, Huang X, Yong H, Shen J, Tang Q, et al. Nicotinamide N-methyltransferase: a potential biomarker for worse prognosis in gastric carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2016 Feb 15;6(3):649-63
28. Cruz-Vicente, P., Gonçalves, A.M., Barroca-Ferreira, J., Silvestre, S.M., Romao, M.J., Queiroz, J. A., et al. (2022). Unveiling the biopathway for the design of novel COMT inhibitors. *Drug Discovery Today*, 27(10), 103328.
29. Cuffari, L., et al., Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. 102(1): p. 56-61.
30. D'Cruz, A.K., et al., Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med*, 2015. 373(6): p. 521-9.
31. de Moraes, E.F., et al., Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. *J Oral Maxillofac Surg*, 2017. 75(7): p. 1555-1566.
32. De Stefani, E., et al., Dietary patterns and risk of cancer of the oral cavity and pharynx in Uruguay. *Nutr Cancer*, 2005. 51(2): p. 132-9.
33. Dhanuthai, K., et al., A Multicenter Study of Tongue Lesions from Thailand. *Eur J Dent*, 2020. 14(3): p. 435-439.
34. Dorta, R.G., et al., Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral

35. Edge, S.B. and American Joint Committee on Cancer., AJCC cancer staging manual. 7th ed. 2010, New York: Springer. xiv, 648 p.
36. El-Etreby, N.M., El Badawy, N.A., Nour, H.A., Osman, E.M. (2021). Relationship between 17 β estradiol (17 β E) levels and Catechol-O-methyltransferase (COMT) levels in ovarian cancers. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 42(4), 757-762.
37. Emanuelli M, Santarelli A, Sartini D, Ciavarella D, Rossi V, Pozzi V et al. Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2010 Jan;25(1):15-20.
38. Garavello, W., et al., The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol*, 2009. 58(1-2): p. 25-34.
39. Gehrmann ML, Fenselau C, Hathout Y. Highly altered protein expression profile in the adriamycinresistant MCF-7 cell line. *J Proteome Res*. 2004 May-Jun;3(3):403-9.
40. Gildener-Leapman, N., R.L. Ferris, and J.E. Bauman, Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2013. 49(12): p. 1089-96.
41. Goldstein, B.Y., et al., Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev*, 2010. 19(6): p. 431-65.
42. Gu, D.H., et al., CT, MR, (18)F-FDG PET/CT, and their combined use for the assessment of mandibular invasion by squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Acta Radiol*, 2010. 51(10): p. 1111-9.
43. Gvetadze SR, Ilkaev KD. Lingual lymph nodes: Anatomy, clinical considerations, and oncological significance. *World J Clin Oncol*. 2020 Jun 24;11(6):337-347. doi: 10.5306/wjco.v11.i6.337. PMID: 32874949; PMCID: PMC7450815.
44. Haddadin, K.J., et al., Improved survival for patients with clinically T1/T2, N0 tongue tumors undergoing a prophylactic neck dissection. *Head Neck*, 1999. 21(6): p. 517-25.

45. Hechler, B., et al., Are Oral Pain and Otalgia Predictive of Perineural Invasion in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue? *J Oral Maxillofac Surg*, 2020. 78(8): p. 1418-1426.
46. Heerema, M.G., et al., Reproducibility and prognostic value of pattern of invasion scoring in low-stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 2016. 68(3): p. 388-97.
47. Helliwell, T. and J.A. Woolgar, Standards and datasets for reporting cancers: Dataset for histopathology reporting of mucosal malignancies of the oral cavity. 2013, Royal College of Pathologists: London.
48. Hiratsuka C, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K. Time-dependent effects of L-tryptophan administration on urinary excretion of L-tryptophan metabolites. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2014;60(4):255-60.
49. Howlader N, et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017. National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/. based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.
50. Husain, R.S. and V. Ramakrishnan, Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Ann Glob Health*, 2015. 81(5): p. 675-83.
51. Hussein, A.A., et al., Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer*, 2017. 82: p. 115-127.
52. Ibrahim, S.A., et al., Elective neck dissection in T1/T2 oral squamous cell carcinoma with N0 neck: essential or not? A systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2020. 277(6): p. 1741-1752.
53. Iftikhar H, Rozi S, Zahid N, Awan MS, Nathani KR. Lymph node ratio as a prognostic marker of oral tongue squamous cell carcinoma: a cohort study. *Ann R Coll Surg Engl*. 2020 Nov;102(9):726-732. doi: 10.1308/rcsann.2020.0173. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32808800; PMCID: PMC7591619.
54. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Jun;154(2):103-16.

55. Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res.* 2004;14(10):491-9.
56. Jesse, R.H., et al., Cancer of the oral cavity. Is elective neck dissection beneficial? *Am J Surg*, 1970. 120(4): p. 505-8.
57. Joseph, L.J., et al., Racial disparities in squamous cell carcinoma of the oral tongue among women: a SEER data analysis. *Oral Oncol*, 2015. 51(6): p. 586-92.
58. Jovanovic, A., et al., Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 1993. 22(10): p. 459-62.
59. Kim, Y.J. and J.H. Kim, Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 7877.
60. Kumar JS, Subramanian VS, Kapadia R, Kashyap ML, Said HM. Mammalian colonocytes possess a carrier-mediated mechanism for uptake of vitamin B3 (niacin): studies utilizing human and mouse colonic preparations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 Aug 1;305(3): G207-13. Epub 2013 Jun 6. 7749.
61. Kundu, S.K. and M. Nestor, Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol*, 2012. 33(3): p. 707-21. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95.
62. La Vecchia, C., et al., Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol*, 2004. 40(4): p. 433-9.
63. Larson, A.R., et al., Beyond Depth of Invasion: Adverse Pathologic Tumor Features in Early Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope*, 2020. 130(7): p. 1715-1720.
64. Lee, C.C., et al., Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients: a matched pair analysis. *Acta Otolaryngol*, 2007. 127(11): p. 1214-7.
65. Lenze, N.R., et al., Age and risk of recurrence in oral tongue squamous cell carcinoma: Systematic review. *Head Neck*, 2020.
66. Li, C., et al., Magnetic resonance imaging for diagnosis of mandibular involvement from head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014. 9(11): p. e112267.

67. Licitra, L., et al., Evaluation of the benefit and use of multidisciplinary teams in the treatment of head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2016. 59: p. 73-79.
68. Licitra, L., Tumori della testa e del collo : integrazione terapeutica nella conservazione della funzione d'organo. 2011, Milano: Springer. xxiii, 446 p.
69. Liebig, C., et al., Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, 2009. 115(15): p. 3379-91.
70. Lindberg, R., Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer*, 1972. 29(6): p. 1446-9.
71. Lissowska, J., et al., Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev*, 2003. 12(1): p. 25-33.
72. Lucenteforte, E., et al., Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncol*, 2009. 45(6): p. 461-7.
73. Maloney, B.; Kubisztal, M.; Ge, Z.; Lu, Y.; Strotmann, L.; Budzińska, A.; Rooney, M.F.; Karavyraki, M.; Knox, A.; Porter, R.K. Efficacious Anti-Cancer Drugs Targeting Nicotinamide *N*-Methyltransferase (NNMT) in Cultured Human Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). *Pharmaceuticals* **2026**, *19*, 516. <https://doi.org/10.3390/ph19030516>
74. Markert JM, Fuller CM, Gillespie GY, Bubien JK, McLean LA, Hong RL, et al. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics*. 2001 Feb 7;5(1):21-33. 8076.
75. Mascitti M, Sartini D, Togni L, et al. Differential expression of nicotinamide N-methyltransferase in primary and recurrent ameloblastomas and odontogenic keratocysts. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(4): e13220.
76. Mascitti, M., et al., American Joint Committee on Cancer staging system 7th edition versus 8th edition: any improvement for patients with squamous cell carcinoma of the tongue? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2018.
77. Mascitti, M., et al., Histological Features and Survival in Young Patients with HPV Negative Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Dis*, 2020.

78. Mascitti, M., et al., The addition of tumour-stroma ratio to the 8th AJCC staging system
79. Merks, M.A., et al., Effectiveness of routine follow-up of patients treated for T1-2N0 oral squamous cell carcinomas of the floor of mouth and tongue. *Head Neck*, 2006. 28(1): p. 1-7.
80. 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.
81. Mork, J., B. Moller, and E. Glatte, Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study. *Oral Oncol*, 1999. 35(4): p. 360-7.
82. Nemes, J.A., et al., Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res*, 2008. 14(1): p. 85-92.
83. Neville, B.W. and T.A. Day, Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, 2002. 52(4): p. 195-215.
84. Newman, A.N., et al., Carcinoma of the tongue in persons younger than 30 years of age. *Arch Otolaryngol*, 1983. 109(5): p. 302-4.
85. Ng, J.H., et al., Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*, 2017. 39(2): p. 297-304.
86. Ng, J.H., et al., Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*, 2017. 39(2): p. 297-304.
87. Nikiforov A, Dölle C, Niere M, Ziegler M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem*. 2011 Jun 17;286(24):21767-78.
88. Ogden, G.R., Alcohol and oral cancer. *Alcohol*, 2005. 35(3): p. 169-73.
89. Okamoto H, Ishikawa A, Yoshitake Y, Kodama N, Nishimuta M, Fukuwatari T et al. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide. *Am J Clin Nutr*. 2003 Feb;77(2):406-10.
90. Ong, C.K. and V.F. Chong, Imaging of tongue carcinoma. *Cancer Imaging*, 2006. 6: p. 186-93.

91. Paderno, A., R. Morello, and C. Piazza, Tongue carcinoma in young adults: a review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2018. 38(3): p. 175-180.
92. Patel, S.C., et al., Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*, 2011. 29(11): p. 1488-94.
93. Peng H, Yang HW, Song LW, Zhou Z. Screening the differential expression of adriamycin-resistance related genes of breast cancer by cDNA microarray. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009 Jul 7;89(25):1745-8.
94. Peng, S., Tong, X., Liu, S., Feng, Y., Fan, H. (2015). Association between the COMT 158 G/A polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 17739.
95. Pignon, J.P., et al., Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*, 2009. 92(1): p. 4-14.
96. Pissios P. Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 May;28(5):340-353. Epub 2017 Mar 11.
97. Pozzi V, Mazzotta M, Lo Muzio L, et al. Inhibiting proliferation in KB cancer cells by RNA interference- mediated knockdown of nicotinamide N-methyltransferase expression. *Int J Immunopathol Pharmacol*.24:69–77. 2011.
98. Pozzi V, Salvolini E, Lucarini G, et al. Cancer stem cell enrichment is associated with enhancement of nicotinamide N-methyltransferase expression. *IUBMB Life*. 2020;72(7):1415-1425.
99. Pozzi V, Sartini D, Morganti S, Giulianti R, Di Ruscio G, Santarelli A, et al. RNA-mediated gene silencing of nicotinamide N-methyltransferase is associated with decreased tumorigenicity in human oral carcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Aug 21;8(8): e71272.
100. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(2):784-98

101. Prince, S. and B.M. Bailey, Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1999. 37(3): p. 164-74.
102. Rahimi, S., HPV-related squamous cell carcinoma of oropharynx: a review. *J Clin Pathol*, 2020. 73(10): p. 624-629.
103. Rehm, J., Alcohol consumption and mortality. What do we know and where should we go? *Addiction*, 2000. 95(7): p. 989-95.
104. Renkonen, S., et al., Site-specific familial risk and survival of familial and sporadic head and neck cancer. *Int J Cancer*, 2017. 141(3): p. 497-502.
105. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009 Mar 23; 2:45-60.
106. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT; American Head and Neck Society; American Academy of Otolaryngology--Head and Neck Surgery. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Jul;128(7):751-8. doi: 10.1001/archotol.128.7.751. PMID: 12117328.
107. Rogers CD, Fukushima N, Sato N, Shi C, Prasad N, Hustinx SR, et al. Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs. *Cancer Biol Ther*. 2006 Oct;5(10):1383-9.
108. Roth, J.A. (1992). Membrane-bound catechol-O-methyltransferase: a reevaluation of its role in the O-methylation of the catecholamine neurotransmitters (pp. 1-29). Springer Berlin Heidelberg.
109. Rutherford, K., Le Trong, I., Stenkamp, R. E., Parson, W.W. (2008). Crystal structures of human 108V and 108M catechol O-methyltransferase. *Journal of molecular biology*, 380(1), 120-130.

110. Sartini D, Pozzi V, Renzi E, Morganti S, Rocchetti R, Rubini C, et al. Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease. *Biol Chem*. 2012 May;
111. Sartini D, Santarelli A, Rossi V, Goteri G, Rubini C, Ciavarella D et al. Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med*. 2007 Jul-Aug;13(7-8):415-21
112. Satgunaseelan, L., et al., The incidence of squamous cell carcinoma of the oral tongue is rising in young non-smoking women: An international multi-institutional analysis. *Oral Oncol*, 2020. 110: p. 104875.
113. Satgunaseelan, L., et al., The incidence of squamous cell carcinoma of the oral tongue is rising in young non-smoking women: An international multi-institutional analysis. *Oral Oncol*, 2020. 110: p. 104875.
114. Schilling, C., et al., Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer. *Eur J Cancer*, 2015. 51(18): p. 2777-84.
115. Seta R, Mascitti M, Campagna R, Sartini D, Fumarola S, Santarelli A, et al. Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in HSC-2 OSCC cell line: effect on apoptosis and cell proliferation. *Clin Oral Investig*. 2019 Feb;23(2):829-838.
116. Shlomi T, Rabinowitz JD. Metabolism: Cancer mistunes methylation. *Nat Chem Biol*. 2013 May;9(5):293-4.
- squamous cell carcinomas. *Histopathology*, 2002. **41**(2): p. 152-7.
117. Standring, S., *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. Forty-first edition. ed. 2016, New York: Elsevier Limited. xviii, 1562 pages.
118. Stich, H.F., B.B. Parida, and K.D. Brunnemann, Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer*, 1992. 50(2): p. 172-6.

119. Syrjanen, K., et al., Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, 1983. 12(6): p. 418-24.
120. Tahara, T., Shibata, T., Arisawa, T., Nakamura, M., Yamashita, H., Yoshioka, D., et al. (2009). Impact of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism on promoter methylation status in gastric mucosa. *Anticancer research*, 29(7), 2857-2861.
121. Thompson, P.A. (2019). Finding the responders in the cancer prevention trials. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(7), 639-640.
122. Tilstone, C., Dentists: a crucial part to play in oral cancer. *Lancet Oncol*, 2007. 8(7): p. 575.
123. Troiano, G., et al., The immune phenotype of tongue squamous cell carcinoma predicts early relapse and poor prognosis. *Cancer Med*, 2020.
124. Ulanovskaya OA, Zuhl AM, Cravatt BF. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nat Chem Biol*. 2013 May;9(5):300-6.
125. Umstattd, L.A., et al., Shrinkage in oral squamous cell carcinoma: An analysis of tumor and margin measurements in vivo, post-resection, and post-formalin fixation. *Am J Otolaryngol*, 2017. 38(6): p. 660-662.
126. van Monsjou, H.S., et al., Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol*, 2013. 49(12): p. 1097-102.
127. Wang, F.Y., Wang, P., Zhao, D.F., Gonzalez, F.J., Fan, Y.F., Xia, Y.L., et al. (2021). Analytical methodologies for sensing catechol-O-methyltransferase activity and their applications. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(1), 15-27.
128. Wang, M., et al., Correlation of Betel Quid with Oral Cancer from 1998 to 2017: A Study Based on Bibliometric Analysis. *Chin Med J (Engl)*, 2018. 131(16): p. 1975-1982.
129. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol*, 2005. 41(3): p. 244-60.

130. Weisz, J., Fritz-Wolz, G., Gestl, S., Clawson, G.A., Creveling, C.R., Liehr, J.G., & Dabbs, D. (2000). Nuclear localization of catechol-O-methyltransferase in neoplastic and nonneoplastic mammary epithelial cells. *The American Journal of Pathology*, 156(6), 1841-1848.
131. Wilsnak R W et al., Gender differences in alcohol consumption and adverse drinking consequences: cross-cultural patterns. *Addiction*. 2000 Feb;95(2):251-65.
132. Wu, W., Zhang, J., Zhou, L., You, L., Zhao, Y., Li, J. (2012). Increased COMT expression in pancreatic cancer and correlation with clinicopathologic parameters. *Science China Life Sciences*, 55(9), 747-752.
133. Xie X, Liu H, Wang Y, Zhou Y, Yu H, Li G, et al. Nicotinamide N-methyltransferase enhances resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells through inhibition of the ASK1-p38 MAPK pathway. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;
134. Xu J, Capezzone M, Xu X, Hershman JM. Activation of nicotinamide N-methyltransferase gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta in human papillary thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2005 Feb;19(2):527-39.
135. Xu Y, Liu P, Zheng DH, Wu N, Zhu L, Xing C, et al. Expression profile and prognostic value of NNMT in patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):19975-81.
136. Yager, J.D. (2012). Catechol-O-methyltransferase: characteristics, polymorphisms and role in breast cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 9(1-2), e41-e46.
137. Yamada K, Miyazaki T, Hara N, Tsuchiya M. Interferon-gamma elevates nicotinamide N-methyltransferase activity and nicotinamide level in human glioma cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(2):83-6.
138. Yosef, E., et al., Squamous cell carcinoma of the oral tongue: Distinct epidemiological profile disease. *Head Neck*, 2020. 42(9): p. 2316-2320.

139. Yu T, Wang YT, Chen P, Li YH, Chen YX, Zeng H, et al. Effects of nicotinamide N-methyltransferase on PANC-1 cells proliferation, metastatic potential and survival under metabolic stress. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(2):710-21.
140. Zhang J, Wang Y, Li G, Yu H, Xie X. Down-Regulation of Nicotinamide N-methyltransferase Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via the Mitochondria-Mediated Pathway. *PLoS One*. 2014 Feb 18;9(2):e89202.
141. Zhang W, Jing Y, Wang S, Wu Y, Sun Y, Zhuang J, Huang X, Chen S, Zhang X, Song Y, Hu Q, Ni Y. Identification of Biological Functions and Prognostic Value of NNMT in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 2022 Oct 15;12(10):1487. doi: 10.3390/biom12101487. PMID: 36291696; PMCID: PMC9599733.