

*“Non come chi vince sempre,
ma come chi non molla mai”*

Frida Kahlo

*Alla mia famiglia,
per aver sempre creduto nei miei sogni e
per avermi insegnato a rialzarmi dopo ogni caduta*

INDICE

CAPITOLO 1: IL CARCINOMA ORALE	3
1.1 INTRODUZIONE	3
1.2 EPIDEMIOLOGIA	3
1.3 I FATTORI DI RISCHIO	6
1.4 CARATTERISTICHE CLINICHE	13
1.5 SEDI ANATOMICHE	18
1.6 ISTOPATOLOGIA	23
1.7 CLASSIFICAZIONE TNM, STADIAZIONE, GRADING	26
CAPITOLO 2: LA BIOPSIA INCISIONALE ED ESCISSIONALE	30
2.1 INTRODUZIONE	30
2.2 BIOPSIA INCISIONALE ED ESCISSIONALE	31
2.3 CONSERVAZIONE E SPEDIZIONE DEL CAMPIONE	33
2.4 FOLLOW-UP DEL PAZIENTE	34
2.5 CONSIDERAZIONI CLINICHE	35
2.6 STRUMENTARIO	35
CAPITOLO 3: IL PUNTO DI VISTA DEL PATOLOGO ORALE	37
3.2 CONSIDERAZIONI CHIRURGICHE	38
3.3 TECNICHE PER EVITARE ARTEFATTI	38
3.4 ORIENTAMENTO	39
3.5 PREPARAZIONE E FISSAZIONE	39
3.6 INFORMAZIONI AL PATOLOGO	40
CAPITOLO 4: TECNICHE BIOPTICHE INNOVATIVE	41
4.1 INTRODUZIONE	41
4.2 PUNCH BIOPSY	42
4.3 BRUSH BIOPSY	44
4.4 BIOPSIA CON LASER	48
BIBLIOGRAFIA	51

CAPITOLO 1: IL CARCINOMA ORALE

1.1 INTRODUZIONE

Il carcinoma orale, di cui la tipologia più diffusa è rappresentata dal carcinoma a cellule squamose, risulta essere una tra le neoplasie più diffuse al mondo [1]. Ogni anno si stimano oltre 300,000 nuovi casi di carcinoma orale, con un tasso di sopravvivenza complessiva intorno al 50% [2]. I due terzi dei tumori orali vengono diagnosticati nei Paesi in via di sviluppo [3], che sono maggiormente esposti a fattori di rischio quali: consumo di tabacco e alcol, masticazione di betel, infezione da HPV e malnutrizione.

La lingua è la zona più frequentemente interessata, seguita dal pavimento della bocca e dal labbro. Altre aree coinvolte includono il trigono retromolare, la mucosa della bocca, il palato duro, la gengiva superiore e inferiore. I tassi di prevalenza possono variare in base al sito, alla regione interessata e al sesso [4].

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Nel 2018 si sono verificati 354,864 nuovi casi di carcinoma orale in tutto il mondo. L'incidenza, la prevalenza e i tassi di mortalità variano in base alle aree geografiche, come mostrato nelle Figure 1-3 [5].

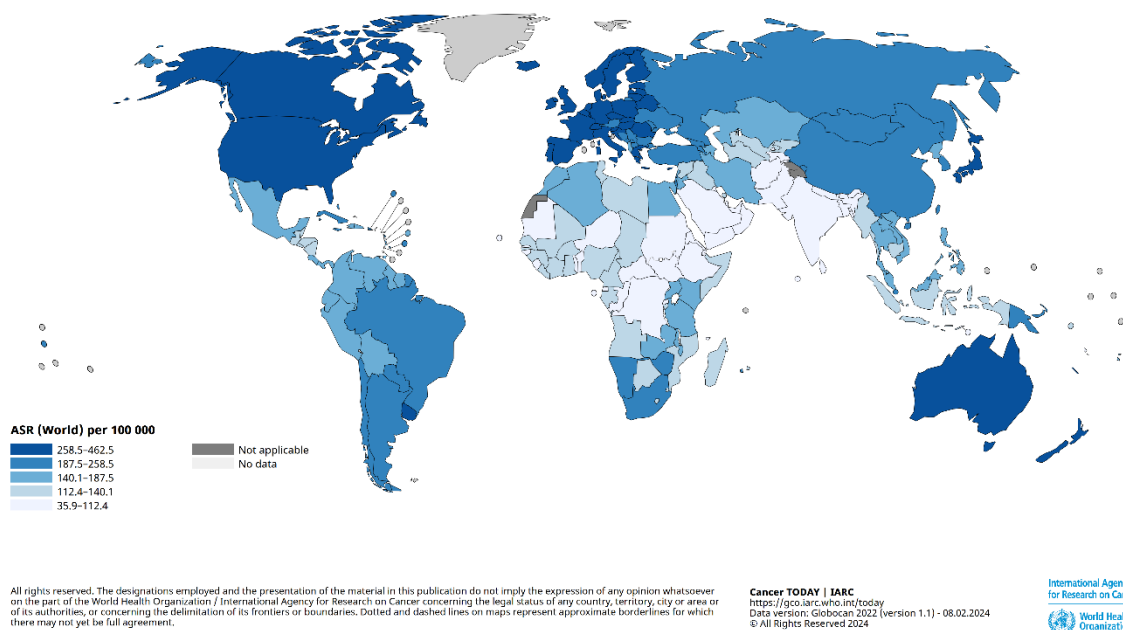


Figura 1. Mappa globale dei tassi di incidenza standardizzata per età nel 2022 per il carcinoma orale e delle labbra per entrambi i sessi (dati derivati da GLOBOCAN 2022).

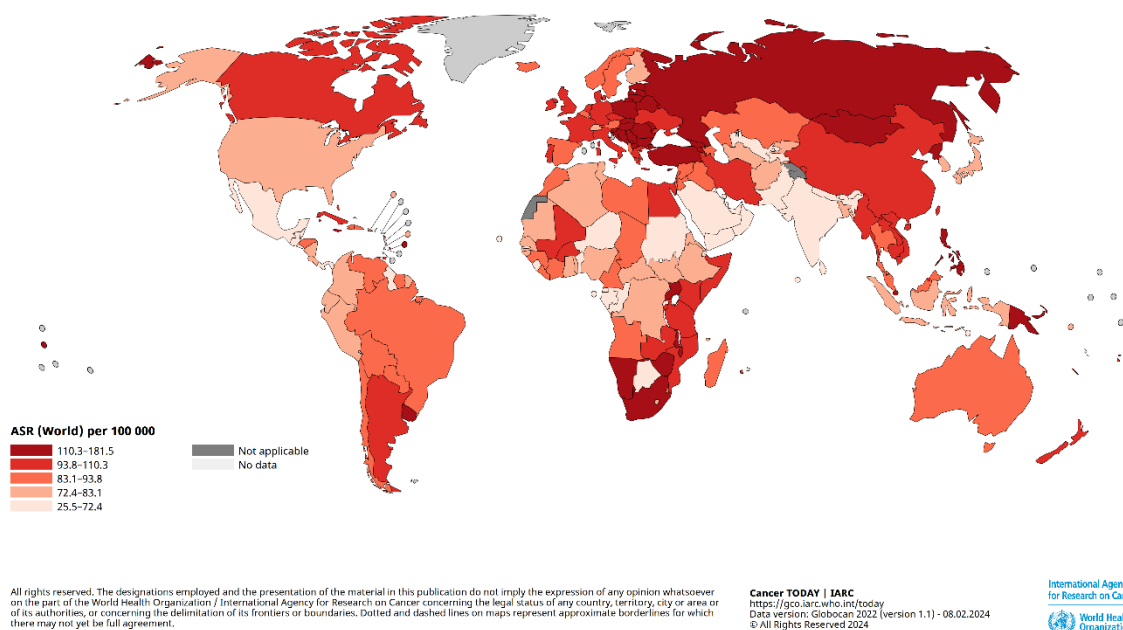
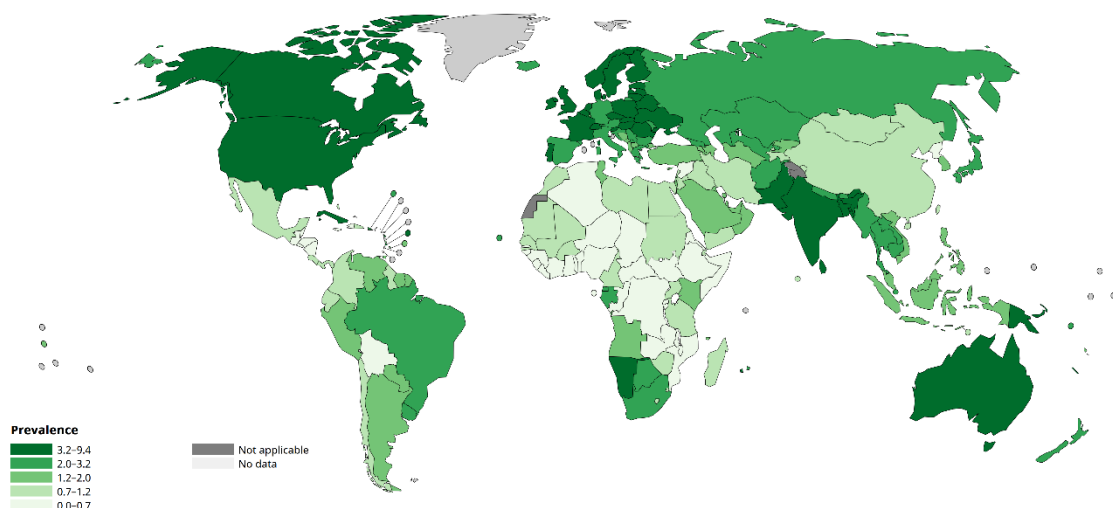


Figura 2. Mappa globale dei tassi di mortalità per età nel 2022 per il carcinoma orale e delle labbra per entrambi i sessi (dati derivati da GLOBOCAN 2022).



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
 Data version: globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024

International Agency
 for Research on Cancer
 World Health
 Organization

Figura 3. Mappa globale dei tassi di prevalenza standardizzati per età del carcinoma orale in entrambi i sessi e in tutte le età (dati derivati da GLOBOCAN 2022).

Il Sud-Est asiatico ha il tasso di incidenza più elevato, seguito dall'Europa, dai Paesi del Mediterraneo orientale, dall'America, dall'Africa e infine dalla regione del Pacifico occidentale. Il tasso di incidenza a livello mondiale si stima essere 15,6 per 100.000 negli uomini e 6,1 per 100.000 nelle donne [6, 7].

Population	Population code (ISO/UN)	Number	ASR (World)	Crude Rate	Cum. risk 74
Africa	903	14 702	1.7	1.1	0.20
Latin America and the Caribbean	904	19 301	2.3	2.9	0.26
Northern America	905	30 992	4.6	8.3	0.55
Europe	908	62 073	4.2	8.3	0.50
Oceania	909	4 338	7.0	9.9	0.81
Asia	935	258 440	4.4	5.6	0.50
Total		389 846	4.0	4.9	0.46

Tabella 1. Incidenza del carcinoma orale nel mondo, entrambi i sessi (dati derivati da GLOBOCAN 2022).

Population	Population code (ISO/UN)	Number	ASR (World)	Crude Rate	Cum. risk 74
Africa	903	8 542	1.0	0.61	0.11
Latin America and the Caribbean	904	8 343	0.98	1.3	0.11
Northern America	905	4 896	0.62	1.3	0.07
Europe	908	24 253	1.6	3.2	0.19
Oceania	909	939	1.4	2.2	0.16
Asia	935	141 465	2.4	3.0	0.27
Total		188 438	1.9	2.4	0.22

Tabella 2. Mortalità del carcinoma orale nel mondo in entrambi i sessi (dati derivati da GLOBOCAN 2022).

I casi di carcinoma orale si manifestano generalmente tra la V e la VII decade di vita [1], anche se negli ultimi anni si è registrato un aumento di casi anche nella popolazione più giovane [8].

1.3 I FATTORI DI RISCHIO

Il consumo di tabacco e l'abuso di alcol sono i fattori di rischio maggiormente coinvolti nello sviluppo del carcinoma orale a cellule squamose. Si stima infatti che circa l'80% di tali neoplasie sia dovuto a queste abitudini viziate [9, 10], pertanto una loro eliminazione potrebbe ridurre l'incidenza sia in Europa che negli USA [11].

Tra gli altri fattori predisponenti all'insorgenza del carcinoma squamocellulare vi sono: i fattori nutrizionali e dietetici, gli agenti infettivi, i traumatismi cronici, le radiazioni ultraviolette, la scarsa igiene orale, i fattori genetici e l'immunodepressione.

Tabacco

Esiste una forte associazione tra il consumo di tabacco e l'insorgenza del carcinoma orale, si considera infatti essere il fattore di rischio maggiormente coinvolto nella carcinogenesi di tale neoplasia. I fumatori hanno un rischio triplo rispetto ai non fumatori di sviluppare carcinoma orale. Questo rischio è molto correlato anche alla dose, infatti i fumatori che consumano dalle 20 alle 80 sigarette al giorno hanno un rischio da 2 a 17 volte maggiore rispetto a chi fuma meno di 20 sigarette al giorno [12].

Smettere di fumare per almeno 4 anni riduce il rischio del 35%, mentre dopo 20 anni di astinenza il rischio è simile a quello dei non fumatori. Nei pazienti che continuano a fumare anche dopo la diagnosi di carcinoma orale e il relativo trattamento, esiste un rischio maggiore di sviluppare ulteriori neoplasie primarie nelle vie aereo-digestive superiori [13, 14].

L'azione dannosa del tabacco è data dalla presenza di oltre 300 prodotti di combustione con effetti mutageni [10]. Inoltre, è da considerarsi un possibile cofattore l'irritazione termica diretta sulle mucose. Questo è evidenziato dal fatto che il *reverse smoking* (l'abitudine di fumare sigarette con l'estremità accesa rivolta verso l'interno della bocca), comune in alcune regioni del Sud Est Asiatico, del Sud America e della Sardegna, è associato a un rischio ulteriormente più elevato di sviluppare questo tipo di cancro.

Altre consuetudini legate all'uso del tabacco che possono causare il carcinoma orale includono il tabacco masticato e lo *snuff* (pratica che consiste nel tenere del tabacco triturato nel fornice labiale). L'effetto nocivo in questi casi è limitato all'area della mucosa a diretto contatto con il tabacco [15]. Alcuni studi dimostrano che il rischio relativo è significativamente inferiore per i consumatori di tabacco senza combustione [16], ma non si possono trarre delle conclusioni certe a causa della grande varietà di tipi di tabacco e

dei trattamenti utilizzati nelle diverse regioni geografiche [9, 17]. In alcune regioni, inoltre, c'è l'abitudine di masticare tabacco miscelato ad altre sostanze, che possono aumentarne l'effetto cancerogeno. Particolarmente significativo è il caso del *quid*, un composto di tabacco frammisto a noci di areca, lime e altre spezie avvolto in una foglia di betel. Questa pratica, molto comune in India e nel Sud Est Asiatico, può scaturire una *fibrosi sottomucosa orale*, una trasformazione della mucosa [18] classificata come lesione precancerosa ad alto tasso di trasformazione maligna [19].

Alcol

È stato ampiamente dimostrato che il consumo di alcol è un fattore di rischio per molte malattie. Il suo ruolo è sinergico a quello del tabacco nello sviluppo del carcinoma squamocellulare orale, con effetto moltiplicativo al rischio. Attraverso studi di popolazione è stato visto che nei soggetti forti fumatori (più di 20 sigarette al giorno) e forti bevitori (più di 5 dosi di bevande alcoliche al giorno) il rischio di sviluppare carcinoma orale è 13 volte superiore a quello stimato senza effetto sinergico tra fumo di tabacco e consumo di alcol, e rispetto ai soggetti non fumatori e non bevitori il rischio di sviluppare il carcinoma orale è fino a 50-100 volte maggiore [11, 20, 21].

Considerando solamente i soggetti forti bevitori (più di 100 grammi di alcol al giorno) e non fumatori, il rischio relativo di sviluppare questo tipo di tumore è dalle 2 alle 6 volte maggiore nei forti bevitori in confronto ai bevitori modesti o ai non bevitori [22, 23]. Il rischio di sviluppare la neoplasia nei forti bevitori è 30 volte più elevato [24]. Parallelamente a quanto concerne il tabacco, anche nel caso dell'alcol il rischio relativo

è dose-dipendente; quindi, aumenta all'aumentare della dose [25] e alla durata dell'esposizione [26].

L'effetto oncogeno dell'alcol è attribuibile a meccanismi indiretti; infatti, l'etanolo di per sé non svolge attività mutagena [27]. Sembrerebbe che il ruolo dell'alcol sia quello di solvente per altri agenti cancerogeni [28], infatti potrebbe irritare e disidratare la mucosa orale determinando un aumento della permeabilità e facilitare quindi il passaggio di tali composti [29]. Questo meccanismo spiega l'effetto carcinogeno dato dall'effetto sinergico di alcol e tabacco, ma non dimostra l'azione cancerogena dell'alcol come fattore di rischio indipendente. Questo effetto carcinogeno indipendente potrebbe essere ricondotto all'*acetaldeide*, metabolita primario dell'etanolo [27,30]. L'effetto nocivo potrebbe essere ulteriormente potenziato da alcuni contaminanti e additivi presenti nell'alcol: idrocarburi policiclici aromatici e nitrosamine [27]. Altri cofattori potrebbero essere riconducibili a deficit nutrizionali e funzionali epatici dovuti all'abuso di alcol [31]. Alla luce di ciò si suppone che ogni tipo di bevanda alcolica contribuisca allo sviluppo del carcinoma orale proporzionalmente alla quantità di etanolo che contiene al suo interno.

Agenti infettivi

Gli agenti infettivi più studiati in ragione del loro coinvolgimento nei processi cancerogeni della mucosa orale sono: HPV, HCV, EBV e *Candida spp.* All'interno del cavo orale la specie di *Candida* comprende un elevato numero di miceti, che di norma in un soggetto sano sono commensali [32]. Nonostante ciò, alcuni fattori predisponenti

locali e sistemici possono provocare l'estrinsecazione di caratteristiche patogene del micete che si manifestano come infezioni che prendono il nome di *candidosi*.

Il ruolo della candidosi nel rischio di trasformazione di disordini potenzialmente maligni, quali leucoplachie non omogenee e/o lesioni displastiche, è una questione di cui si discute molto. Tra le forme più studiate la principale è la *candidosi cronica iperplastica (o leucoplachia candidosa)* [33].

Le modalità di trasformazione maligna dovute a tali specie possono essere ricondotte alla loro capacità di produrre sostanze potenzialmente cancerogene quali nitrosamine endogene, prodotte a partire dalla saliva e dai nitriti presenti nel cavo orale [34,35]. Ciononostante, risulta difficile stabilire se sia il micete il diretto responsabile della lesione, o se sia solamente un colonizzatore secondario. Considerando inoltre la forte associazione tra questa forma di candidosi ed altri fattori eziologici come il fumo [36], ovviamente non è facile determinare con esattezza un indice di trasformazione maligna. Per quanto concerne i virus, l'HPV ha un ruolo centrale nell'insorgenza del carcinoma della mucosa genitale [37, 38, 39], nell'ambito del cavo orale era stata ipotizzata una sua correlazione con lo sviluppo del carcinoma orale, soprattutto se associato alla presenza di DNA virale nelle lesioni orali maligne e/o potenzialmente maligne, in particolar modo la Leucoplachia Verrucosa Proliferativa (LPV) [40]. Tuttavia, questa ipotesi è stata smentita da studi successivi in cui non è stata riscontrata una prevalenza significativa del virus HPV nelle lesioni orali maligne e/o potenzialmente maligne [41]. Pertanto, ad oggi la comunità scientifica ritiene che il rischio cancerogeno derivato dall'infezione da HPV sia da considerarsi per tutte le lesioni potenzialmente maligne o maligne, soprattutto se in concomitanza con altri fattori di rischio (fumo, alcol, fattori genetici) [42, 43], ma esclude una diretta correlazione eziologica tra HPV e LPV. Concludendo non si può affermare

con certezza che ci sia una correlazione causale tra HPV e insorgenza del carcinoma orale a cellule squamose. Il medesimo discorso vale per i virus EBV e HCV in cui non pare esserci una correlazione eziologica diretta [44, 45, 46].

Fattori nutrizionali e dietetici

Il consumo di alimenti ricchi di antiossidanti (vitamina C, carotenoidi, vitamina E) [47, 48] quali frutta e verdura sembra essere associato ad una riduzione del rischio di insorgenza del carcinoma orale [49, 50]. Diversamente, diete ricche di grassi e carni, sbilanciate per eccesso calorico, sono correlate ad un aumento del rischio [51, 52]. Anche nei casi deficitari di ferro [53, 54] e vitamina A è stato riscontrato un aumento del rischio di sviluppo di tale neoplasia [55].

Igiene orale

Soggetti con uno stato di scarsa igiene orale presentano un maggiore rischio di sviluppare il carcinoma orale squamocellulare [12, 56, 57]. Ad ogni modo risulta difficile valutare il ruolo dell'igiene orale come fattore di rischio indipendente poiché spesso tale condizione si trova associata ad altri fattori di rischio quali abuso di alcol e consumo di tabacco [9]. È invece possibile considerare la scarsa igiene orale un modificatore dei meccanismi della cancerogenesi; infatti, una condizione di scarsa igiene orale potrebbe causare un'irritazione cronica delle mucose orali, dando luogo ad un ambiente che facilita l'azione di altri agenti cancerogeni [58].

Traumatismi orali cronici

I traumatismi orali cronici non rappresentano un fattore di rischio definitivamente accertato per il carcinoma orale squamocellulare [55]. Tuttavia, analogamente alla scarsa igiene orale, si può ipotizzare che tali traumatismi provochino stati di irritazione cronica delle mucose, creando così condizioni favorevoli all'azione di altri agenti cancerogeni [55, 58].

Radiazioni ultraviolette

Similmente a ciò che avviene nei tumori cutanei, l'esposizione ai raggi solari è un fattore di rischio certo nello sviluppo di carcinomi a cellule squamose del labbro inferiore [55].

Stati di immunodepressione

Stati di immunodeficienza possono predisporre l'organismo allo sviluppo di carcinoma orale squamocellulare [58-60], il rischio aumenta in concomitanza di altri fattori di rischio [61, 62].

Fattori genetici

La predisposizione genetica all'insorgenza del carcinoma squamocellulare comporta un incremento del rischio di sviluppare questa neoplasia di 2-4 volte [63, 64], e un aumento del rischio di sviluppare carcinomi orali multipli di 4-8 volte [65, 66].

1.4 CARATTERISTICHE CLINICHE

Si stima che più del 90% dei tumori maligni del cavo orale siano carcinomi a cellule squamose. Tali neoplasie sono generalmente precedute da disordini potenzialmente maligni (PMD), ma non necessariamente tutti i PMD si trasformano in carcinomi. Solo nel 2% dei casi il carcinoma squamocellulare presenta foci multipli sincroni o metacroni [67]. Questo tipo di carcinoma possiede una tendenza precoce all'infiltrazione e una maggiore propensione alla diffusione linfatica rispetto a quella ematica. L'infiltrazione linfonodale è influenzata da diverse caratteristiche del carcinoma, tra cui la sede, le dimensioni, l'istotipo tumorale, il grado di differenziazione istologica, l'anatomia e la rete linfatica dell'organo colpito, nonché i rapporti istopatologici con le strutture anatomiche adiacenti. La sede primitiva della neoplasia generalmente incide sul sito di metastatizzazione linfonodale. Normalmente le metastasi a distanza sono rare e si manifestano in fasi avanzate della malattia, l'organo comunemente colpito risulta essere il polmone [68, 69]. Per eseguire una diagnosi accurata di carcinoma orale è fondamentale seguire degli step ben precisi: anamnesi, esame clinico ed esami strumentali.

Anamnesi

Di fronte alla presenza di una lesione all'interno del cavo orale bisogna valutare alcuni aspetti di fondamentale rilievo: il consumo di tabacco e alcol, la scarsa igiene orale, la storia familiare o personale di neoplasie e l'età superiore ai quarant'anni. A livello clinico esistono delle manifestazioni che possono far sospettare che sia una lesione a possibile trasformazione maligna:

- La persistenza di una macchia colorata o bianca squamosa che aumenta all'improvviso di dimensioni;
- Un'ulcera che non tende alla guarigione;
- Presenza di sanguinamento gengivale;
- Improvvisa e progressiva mobilità dentale in assenza di malattia parodontale;
- Alterazioni della sensibilità;
- Serramento o dolore nell'aprire la bocca;
- Asimmetria facciale progressiva;
- Disfagia e difficoltà nel linguaggio.

La dimensione del carcinoma non influisce sul dolore, il quale risulta essere localizzato e in relazione alla funzione [70].

Esame clinico

L'esame clinico si concentra sull'ispezione visiva e sulla palpazione che permette di valutare la consistenza della neoplasia, lo stato dei bordi e l'infiltrazione. Esistono tre forme cliniche di carcinoma orale [71-72]:

- Forma esofitica: si manifesta come una protuberanza sulla mucosa sana, con superficie irregolare e colore variabile tra bianco e bianco-rosato, generalmente caratterizzata da un'organizzazione cellulare ben differenziata quando esaminata istologicamente (Figura 4) [73];

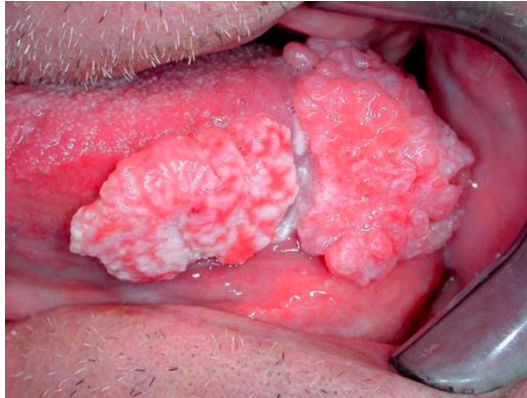


Figura 4. Carcinoma squamocellulare del cavo orale di forma esofitica.

- Forma endofitica: la forma nodulare (Figura 5) appare come un nodulo duro sotto la superficie della mucosa apparentemente intatta. Invece, la forma infiltrante (Figura 6) si contraddistingue per l'indurimento della zona interessata accompagnato da difficoltà funzionali quali deficit nei movimenti della lingua e serramento dei denti.



Figura 5. Carcinoma squamocellulare del cavo orale di forma endofitica nodulare.



Figura 6. Carcinoma squamocellulare del cavo orale di forma endofitica infiltrativa.

- Forma ulcerata: è la forma di più comune riscontro, si trova come ulcerazione dai tratti irregolari e con bordi induriti, spesso rilevati e duri alla palpazione (Figura 7). La base è sanguinante, vegetante, talvolta presenta materiale necrotico. Esiste una variante definita mista, ulcero-vegetante, che è data dall'associazione tra la forma ulcerativa a quella vegetante. La forma erosiva è invece caratterizzata dalla presenza di un'area rossa ad aspetto vellutato o disomogeneo con aree bianche, a livello superficiale.



Figura 7. Carcinoma squamocellulare del cavo orale di forma ulcerativa.

Diagnosi di diffusione linfatica

La diffusione per via linfatica è un evento precoce e costante, escludendo le metastasi a distanza, e rappresenta il fattore prognostico negativo di maggiore rilievo [74]. La frequenza del coinvolgimento linfonodale è influenzata da diversi fattori quali: la dimensione, la profondità d'invasione, lo spessore, la sede interessata, il grado di differenziazione e la durata. I linfonodi maggiormente interessati sono i linfonodi sottomandibolari e sottomentali [75]. I tumori metastatizzano in base alla loro localizzazione primitiva:

- I tumori localizzati sulla linea mediana metastatizzano bilateralmente;
- I tumori in sede laterale metastatizzano in modo monolaterale;

Per valutare il livello di diffusione linfonodale si esegue la palpazione dei linfonodi e si ricorre a tecniche di imaging (ecografia, TC, RM).

Diagnosi di metastasi a distanza

Per verificare la presenza di neoformazioni a distanza si eseguono tecniche di imaging che variano a seconda del distretto corporeo di interesse. Le sedi maggiormente interessate sono il polmone, il fegato e le ossa [76], anche se tuttavia sono di difficile riscontro.

1.5 SEDI ANATOMICHE

Carcinoma della lingua

Uno degli organi maggiormente interessati dal carcinoma orale è sicuramente la lingua [77, 78], in particolar modo a livello dei due terzi posteriori, della superficie ventrale e dei margini laterali. All'esordio la neoplasia appare come un'area leucoplasica o eritroplastica, una piccola ulcera, una massa papillomatosa o un nodulo sottomucoso. La sintomatologia iniziale nella maggior parte dei casi prevede una tumefazione linfonodale a livello sottomandibolare e spesso ancor prima di evocare i sintomi il tumore cresce considerevolmente fino a provocare alterazioni funzionali date dall'entità della massa stessa. Il carcinoma linguale nelle sue fasi più avanzate tipicamente induce sanguinamento, disfonia, disfagia [79] e in caso di infiltrazione del pavimento orale si riscontra anche ostruzione salivare, immobilizzazione della zona sopraioidea con edema marcato e cute a buccia d'arancia. Nel caso di estensione al nervo ipoglosso si potranno riscontrare deficit motori con ostacolo dei movimenti e punta della lingua deviata, mentre se l'irradiazione neoplastica riguarda il nervo linguale si potrà avvertire dolore diffuso irradiato all'orecchio. Solitamente la neoplasia si espande in profondità e quando arriva alla muscolatura avviene il cosiddetto *effetto squeezing* che determina la spremitura delle cellule tumorali con conseguente presenza di focolai neoplastici distinti dalla massa principale. Tale tipo di carcinoma ha un'elevata incidenza di linfadenopatie metastatiche [75].

Carcinoma del pavimento orale

Questa neoplasia rappresenta la seconda più comune tra i carcinomi orali, con un'incidenza del 20% [77]. I sintomi nella zona anteriore del pavimento orale sono frequentemente tardivi e aspecifici, inizialmente manifestandosi come piccole ulcere accompagnate da possibili parestesie o dolore transitorio durante i movimenti linguali. L'invasione del dotto di Wharton può compromettere il flusso salivare, causando tumefazione della ghiandola sottomandibolare corrispondente. Nel caso in cui il tumore si estenda al nervo linguale, il paziente riferisce l'insorgenza di un dolore urente, mentre l'infiltrazione dei piani profondi determina rigidità e difficoltà nella mobilità della lingua. La diffusione oltre la mandibola può provocare tumefazione del labbro inferiore. La crescita tumorale può avvenire in diverse direzioni, includendo il coinvolgimento del corpo della lingua, della ghiandola sottolinguale, del dotto di Wharton e della ghiandola sottomandibolare. La diffusione linfatica è un evento precoce [78].

Per quanto riguarda le porzioni più laterali del pavimento orale, esso rappresenta circa il 18% dei carcinomi orali, caratterizzandosi per una crescita superficiale e una precoce tendenza all'infiltrazione dei piani profondi. Il quadro clinico si manifesta con erosione della mucosa, ulcere o lesioni infiltrate a scodella. I sintomi iniziali sono tardivi e correlati all'estensione tumorale. La diffusione in profondità provoca dolore intenso e duraturo, sensazione di corpo estraneo e difficoltà nei movimenti linguali. L'infiltrazione del nervo mandibolare può determinare anestesia o ipoestesia della regione labiale e mentoniera. La diffusione profonda in direzione mediale è frequente, coinvolgendo la muscolatura linguale estrinseca e diffondendosi lungo la muscolatura stessa.

Carcinoma del labbro

Il carcinoma del labbro rappresenta circa il 20% dei tumori orali e colpisce prevalentemente il sesso maschile. Questa neoplasia è generalmente meno aggressiva rispetto ad altre sedi di carcinoma orale e si caratterizza per un decorso clinico maggiormente indolente e lungo. Il carcinoma del labbro si manifesta principalmente nelle aree maggiormente esposte alla luce solare, come il labbro inferiore (89%) [80]. La forma più comune del carcinoma del labbro è quella esofitica, che talvolta si presenta come un indurimento fortemente cheratinizzato, con superficie irregolare e di colore bianco-marrone. Questa lesione tende ad accrescersi in superficie e, una volta raggiunto un diametro superiore al centimetro, evolve sviluppando necrosi superficiale ed ulcerazione. Nel caso in cui l'ulcerazione si manifesti precocemente, si osserva una tendenza all'infiltrazione, che tuttavia rimane rara. Tale neoplasia ha una progressione lenta e durante il suo sviluppo può presentarsi come un ispessimento epiteliale, sotto forma di ulcere o indurimenti su aree leucoplasiche. La manifestazione clinica iniziale più comune è costituita da croste siero-ematiche ripetute, mentre l'ipoestesia del labbro è un segno indicativo di infiltrazione nervosa. Può diffondersi alla cute circostante e alla mandibola, mentre nelle forme localizzate alle commessure o nelle forme avanzate del labbro inferiore, si può verificare un'invasione perineurale del nervo mentoniero. La diffusione linfatica e l'incidenza di metastasi sono strettamente correlate allo spessore tumorale, al pattern di crescita e all'invasione perineurale.

Carcinoma del trigono retromolare

Questa area è coinvolta in meno del 15% dei casi di carcinoma orale [77]. I sintomi iniziali sono generalmente lievi, ma negli stadi avanzati diventano più evidenti e includono odinofagia, otalgia, dolori alla lingua e trisma progressivo. L'infiltrazione del nervo mandibolare può causare anestesia del labbro. In termini di diffusione, questa neoplasia può estendersi medialmente, inferiormente e superiormente.

Carcinoma della mucosa buccale

I carcinomi in questa zona sono relativamente rari, con un'incidenza del 8-10% [78]. Le forme più comuni sono quelle vegetanti. I sintomi possono includere linfadenopatia sottomandibolare, sensazione di bruciore o presenza di un corpo estraneo, dolore e trisma nelle fasi più avanzate. La diffusione locale del tumore può avvenire in tutte le direzioni.

Carcinoma del palato duro e della gengiva superiore

I tumori del palato duro e della gengiva superiore rappresentano l'1-5% dei carcinomi del cavo orale. Queste neoplasie colpiscono prevalentemente tra i 60 e i 70 anni, con una prevalenza maschile di 5:1 rispetto alle donne. Il carcinoma si manifesta generalmente come un'ulcerazione dolorosa con bordo rialzato, fondo granuloso e talvolta sanguinante. Nei casi di neoplasie delle ghiandole salivari, i sintomi includono una sensazione di ingombro, difficoltà nella masticazione, problemi con la ritenzione della protesi e alterazioni del linguaggio. La diffusione del tumore può interessare i seni paranasali, la

mucosa geniena, la tuberosità del mascellare e lo spazio pterigo-mascellare. Una via particolare di diffusione è quella nervosa, che può estendersi fino alla base cranica e al seno cavernoso [81]. La diffusione linfatica si verifica generalmente in fase avanzata.

Carcinoma della gengiva inferiore

La porzione inferiore della gengiva risulta essere interessata dai carcinomi gengivali nel 75% dei casi [77] e possiamo trovarli in forma esofitica o ulcerativa. Generalmente la diagnosi viene effettuata negli stadi più avanzati in cui l'aspetto clinico e la sintomatologia diventano maggiormente evidenti anche a causa del superamento dei limiti anatomici gengivali con conseguente infiltrazione delle aree vicine. Il coinvolgimento linfonodale avviene tardivamente.

1.6 ISTOPATOLOGIA

Le principali caratteristiche del carcinoma squamocellulare comprendono la differenziazione squamosa e la crescita invasiva, che si manifesta attraverso la rottura della membrana basale e l'estensione nel tessuto sottostante, frequentemente accompagnata da una reazione stromale. L'invasione angio-linfatica e quella perineurale costituiscono ulteriori segni di malignità. Questi tumori vengono classificati in base al grado di differenziazione in:

- **Ben differenziati:** presentano caratteristiche simili all'epitelio squamoso normale (Figura 8).
- **Moderatamente differenziati:** mostrano pleomorfismi nucleari e attività mitotica, comprese mitosi anormali, con un grado inferiore di cheratinizzazione.
- **Scarsamente differenziati:** caratterizzati da cellule immature predominanti, numerose mitosi tipiche e atipiche, e minima cheratinizzazione (Figura 9).

Sebbene la cheratinizzazione sia più probabile nelle prime due tipologie tumorali, essa non dovrebbe rappresentare un criterio istologico rilevante nella classificazione del carcinoma a cellule squamose. La maggior parte di questi tumori sono moderatamente differenziati, pertanto, un grading basato sul parametro della differenziazione risulta avere un valore prognostico limitato rispetto al pattern di invasione.

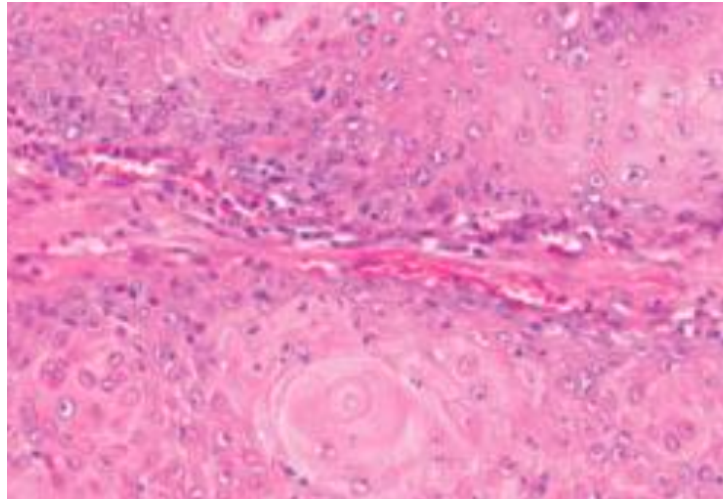


Figura 8. Carcinoma Squamocellulare ben differenziato

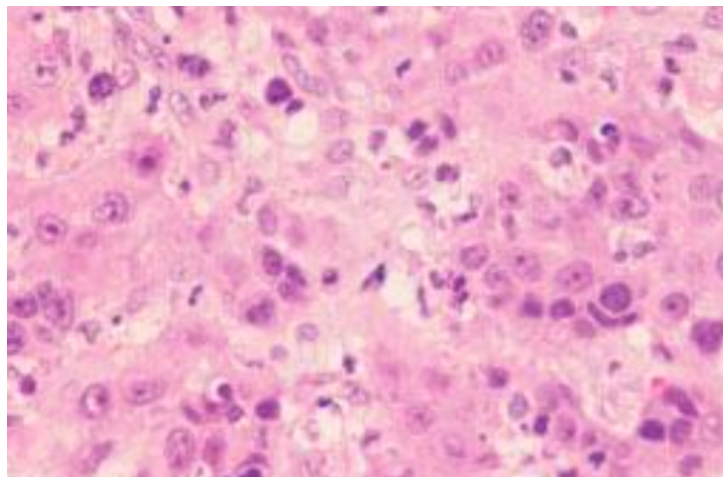


Figura 9. Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato

Per quanto concerne l'invasività, il carcinoma a cellule squamose può crescere con un pattern infiltrativo, un pattern espansivo oppure manifestando entrambi. Il pattern infiltrativo è caratterizzato da cordoni piccoli e irregolari o da singole cellule tumorali con margini infiltrativi scarsamente definiti, associandosi spesso a una prognosi meno favorevole. Invece nel pattern espansivo troviamo delle ampie isole tumorali dotate di margini di invasione ben definiti, quest'ultimo è generalmente associato a un decorso

meno aggressivo e di conseguenza ad una prognosi più favorevole [82]. Dal punto di vista stromale, il carcinoma squamocellulare con pattern invasivo è quasi sempre accompagnato da una reazione stromale desmoplastica, che comporta la deposizione di matrice extracellulare e la proliferazione di miofibroblasti [83]. Sul piano immunologico, il carcinoma a cellule squamose esprime marcatori epiteliali, ad esempio le citocheratine. Durante la trasformazione maligna, gli schemi di espressione dei sottotipi di citocheratina possono differire, influenzandone il grado istologico, il grado di cheratinizzazione e la probabilità di metastasi. I tumori a basso grado esprimono citocheratine a peso molecolare medio-alto, analogamente al normale epitelio squamoso, mentre i tumori ad alto grado tendono a perdere questa espressione in favore di citocheratine a basso peso molecolare [84]. I tumori ad alto grado possono inoltre esprimere vimentine [85]. Tramite microscopia elettronica, è possibile osservare la presenza di desmosomi e tonofilamenti [86].

1.7 CLASSIFICAZIONE TNM, STADIAZIONE, GRADING

La classificazione TNM costituisce il sistema di valutazione volto a valutare l'estensione anatomica della lesione neoplastica e si basa sull'individuazione di tre parametri: "T" si riferisce alla dimensione del tumore primitivo (Tabella 3), "N" corrisponde alla presenza e al grado di coinvolgimento dei linfonodi regionali (Tabelle 4° e 4b), "M" indica la presenza o l'assenza di metastasi a distanza (Tabella 5). Al fine di realizzare la classificazione clinica cTNM vengono raccolti dei dati prima dell'inizio della terapia attraverso l'esame obiettivo, le tecniche di imaging, la biopsia ed eventuali esami specifici. L'esame istologico sarà poi necessario per la conferma della diagnosi.

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	<i>Labbro</i> : tumore che invade la corticale ossea o il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale o la cute del viso. <i>Cavo orale</i> : tumore che invade le strutture anatomiche adiacenti (es. la corticale ossea, il seno mascellare o la cute del viso). Nota: l'erosione superficiale dell' osse / alveolo dentale (da sola) da parte di un tumore primario localizzato gengivalmente non è sufficiente per classificare un tumore come T4
T4b	<i>Cavo orale</i> : tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o la carotide interna.

Tabella 3. Parametro T (grandezza ed estensione del tumore solido).

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	Metastasi in almeno un linfonodo clinicamente ENE(+)

Tabella 4a. Parametro cN (grado di coinvolgimento linfonodale regionale, valutazione prima della terapia).

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(+)

Tabella 4b. Parametro pN (grado di coinvolgimento linfonodale regionale, si effettua se il paziente è idoneo alla terapia chirurgica).

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

Tabella 5. Parametro M (indica la presenza/assenza di metastasi a distanza).

La classificazione patologica (pTNM) può essere effettuata solo dopo l'esame completo dei campioni operatori; pertanto, è applicabile solo ai casi sottoposti a terapia chirurgica. Vengono prese in considerazione le stesse variabili della classificazione cTNM ma la valutazione è effettuata sulla base di misurazioni al microscopio. Successivamente la combinazione dei risultati dell'indagine TNM viene classificata in stadi, ad ognuno dei quali è associata una prognosi (Tabella 6) [87].

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

Tabella 6. Sistema di stadiazione del carcinoma orale secondo l'ottava edizione dell'AJCC.

Quanto più un tessuto tumorale differisce dalle caratteristiche istologiche del tessuto di origine, tanto maggiore è la sua aggressività e di conseguenza tanto peggiore sarà la prognosi. Data la rilevanza di questa evidenza è stata introdotta una categoria diagnostica istopatologica (G) per il carcinoma orale (Tabella 7).

G	G Definition
GX	Non può essere valutato
G1	Ben differenziato
G2	Moderatamente differenziato
G3	Scarsamente differenziato

Tabella 7. Classificazione del grado istologico del carcinoma orale.

CAPITOLO 2: LA BIOPSIA INCISIONALE ED ESCISSIONALE

2.1 INTRODUZIONE

La biopsia è una procedura chirurgica che permette di ottenere campioni rappresentativi di tessuto patologico da organismi viventi. Tali campioni vengono sottoposti a successivi esami diagnostici per formulare o confermare una diagnosi di malattia, nonché per monitorare eventuali evoluzioni della patologia nel corso del tempo. Risulta necessario eseguire una biopsia in presenza dei seguenti segni clinici: la persistente ulcerazione della mucosa, la presenza di lesioni a rapida velocità di crescita, la scarsa mobilità nei piani sottostanti alla lesione (segno di infiltrazione), la consistenza aumentata o l'eccessiva fragilità; nel caso di lesioni bianche, rosse o miste, in presenza di parestesia o tumefazioni persistenti, palpabili e visibili al di sotto di una mucosa apparentemente normale al di sotto di una lesione persistente. Altri casi in cui è indicato eseguire una biopsia è la presenza di lesioni che persistono da più di due settimane, con superficie e bordi irregolari e senza apparente eziologia, in caso di lesioni infiammatorie che non rispondono a trattamento locale e infine, in caso di lesioni che interferiscono con la funzionalità locale (papillomi e fibromi) [88]. Possono essere eseguite biopsie periodiche nel caso di pazienti affetti da patologie croniche, quali disordini potenzialmente maligni, che devono essere monitorati nel tempo poiché la mucosa risulta più suscettibile a trasformazione maligna [89].

Una biopsia, per essere appropriata, dovrebbe includere la parte più rappresentativa della lesione, questa zona può essere individuata sia dalle caratteristiche cliniche sia mediante l'ausilio di metodiche ancillari come le colorazioni vitali e i mezzi ottici. Ulteriori fattori

determinanti la buona riuscita della biopsia, quindi per ottenere un risultato più certo, sono la procedura dell'atto chirurgico e la corretta conservazione del campione prelevato.

2.2 BIOPSIA INCISIONALE ED ESCISSIONALE

Sulla base della presentazione clinica della lesione, dell'estensione e della localizzazione, l'operatore sceglierà se eseguire la biopsia escissionale o una o più biopsie incisionali [90]. L'aspetto clinico del carcinoma orale può variare molto, inoltre è fondamentale l'identificazione di lesioni potenzialmente maligne e displastiche del cavo orale.

Biopsia escissionale

La biopsia escissionale consiste in un atto chirurgico volto alla totale esportazione della lesione, risulta quindi contemporaneamente un atto diagnostico e terapeutico (Figura 10). Tale tipologia di biopsia è riservata a lesioni di piccole e medie dimensioni (entro i 2 cm) in cui si ipotizzi una natura benigna e di facile accessibilità; oppure a lesioni con forte sospetto di malignità ma di piccole dimensioni (entro 5 cm). Nell'esecuzione di una biopsia escissionale in una lesione ipoteticamente benigna andrebbero inclusi almeno 2-3 cm di tessuto sano perimetrale alla lesione; mentre per le lesioni con forte sospetto di malignità è buona norma includere almeno 5 cm lungo il perimetro della lesione.

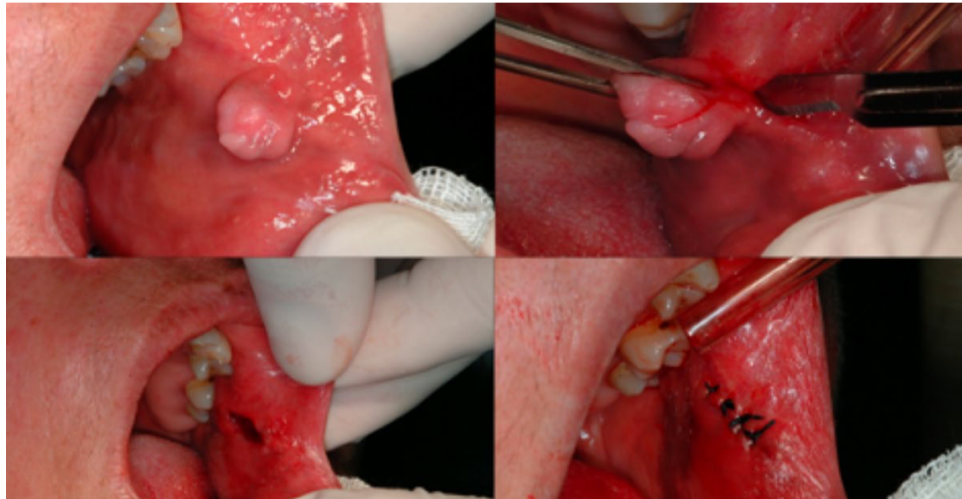


Figura 10. Biopsia escissionale di una lesione esofitica della mucosa geniena. (Fonte: IL CARCINOMA ORALE a cura di Lorenzo Lo Muzio).

Biopsia incisionale

Per biopsia incisionale si intende l'asportazione di una porzione di tessuto, rappresentativo della lesione, a fini diagnostici. Generalmente, le indicazioni per eseguire tale biopsia sono da riservarsi a lesioni apparentemente maligne in cui non è possibile eseguire una biopsia escissionale, lesioni di grandi dimensioni, alterazioni tissutali della mucosa orale (disordini potenzialmente maligni) e lesioni di difficile accesso (Figura 11). Lo scopo di questa indagine è quello di avere una conferma istologica della patologia, per questo è pertinente eseguire questo tipo di biopsia nei casi di sospetta malignità, in modo tale da individuarne lo stadio e indirizzarne la terapia. In secondo luogo, la biopsia incisionale richiede un'alterazione minore dell'anatomia locale, facilitando in seguito l'individuazione della zona iniziale della lesione [91]. Le zone in cui le lesioni sono a maggior rischio di trasformazione maligna, dove si riscontrano più facilmente displasie o

carcinomi, si riscontrano a livello del pavimento della bocca, sul bordo e sul ventre della lingua, sul trigono retromolare o zone ulcerate da tempo senza una diagnosi [92-93]. Nel caso di lesioni molto grandi la biopsia incisionale può essere anche multipla (*mappatura del cavo orale*). Di fronte a lesioni di grandi dimensioni è sconsigliato prelevare parti clinicamente necrotiche poiché inutilizzabili o poco informative a livello istologico. In generale qualora non si fosse completamente certi del tessuto prelevato è opportuno eseguire biopsie incisionali multiple.

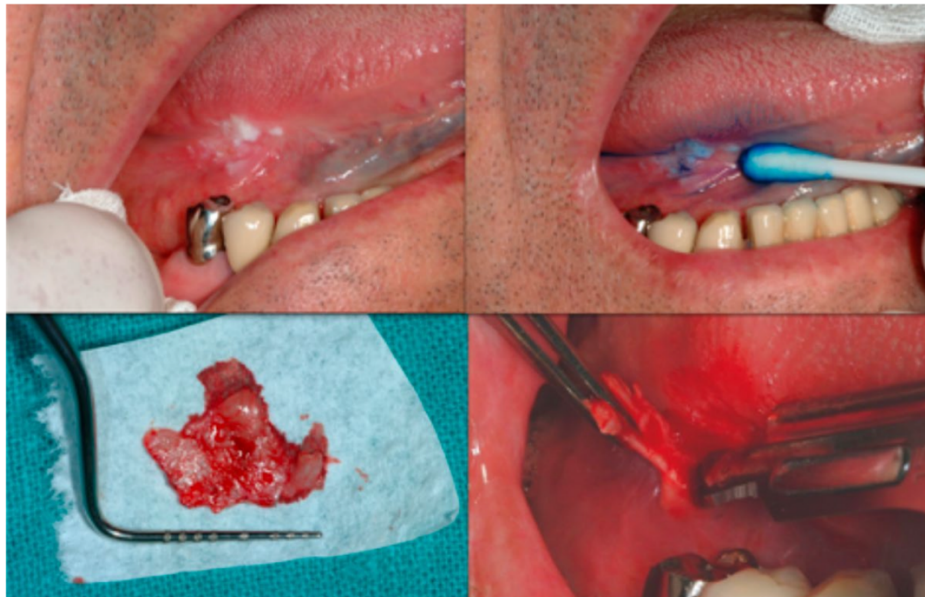


Figura 101. Biopsia Incisionale di una lesione del margine linguale destro (Fonte: IL CARCINOMA ORALE a cura di Lorenzo Lo Muzio).

2.3 CONSERVAZIONE E SPEDIZIONE DEL CAMPIONE

Il campione, adeguatamente orientato e posizionato su carta bibula, deve essere immerso in una soluzione di formalina tamponata al 10%, con l'obiettivo di arrestare i processi di autodigestione cellulare e di putrefazione, dovuti alla possibile colonizzazione batterica.

Attualmente, i contenitori utilizzati per la fissazione in formalina, sono progettati come sistemi chiusi per impedirne la fuoriuscita, essendo la formalina una sostanza altamente cancerogena. Per contenere eventuali perdite di formalina, il campione, sigillato all'interno del contenitore e identificato mediante etichetta adesiva posta sul recipiente, deve essere avvolto in carta assorbente e poi collocato in una scatola rigida che ne impedisca lo schiacciamento. Dopodiché, il campione può essere inviato al laboratorio di anatomia patologica, sempre accompagnato da un documento con le generalità del paziente, dell'operatore, il sospetto diagnostico ed eventuali quesiti. Il tutto può essere anche corredato da una documentazione fotografica. Nel caso di biopsie intraoperatorie o per tecniche successive di immunofluorescenza diretta, i campioni biotici non devono essere immersi in formalina [94].

2.4 FOLLOW-UP DEL PAZIENTE

Essendo la biopsia un atto chirurgico, è buona norma dimettere il paziente solo dopo aver raggiunto una buona emostasi. Dopo una settimana, il paziente viene rinviato a visita di controllo per la rimozione dei punti e per verificare la buona guarigione della ferita. Nel momento in cui il referto sarà pronto il paziente verrà richiamato nuovamente per la spiegazione di quanto diagnosticato e per la eventuale pianificazione di un'ulteriore terapia.

2.5 CONSIDERAZIONI CLINICHE

Generalmente le biopsie sono considerate atti chirurgici minori, i quali non implicano generalmente complicanze intra o post-operatorie. Tuttavia, al fine di svolgere la procedura in sicurezza e senza danneggiare il tessuto prelevato, devono essere prese alcune precauzioni. Bisogna prestare attenzione alle limitanti anatomiche (vasi, nervi e dotti): nel palato duro scorre l'arteria palatina; nelle zone premolari del fornice inferiore è presente lo sbocco del nervo mentoniero; nel labbro inferiore decorrono i rami terminali del nervo mentoniero; lo sbocco delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali; il dotto di Stenone in cui si potrebbe verificare una *sialoadenite* da ostruzione. Inoltre, un aiuto all'esecuzione della biopsia, potrebbe essere quello di utilizzare suture di grosso diametro e garze e pinze per immobilizzare i tessuti qualora la mucosa sia alquanto mobile (generalmente lingua e guance). Infine, bisogna prestare attenzione alla trazione del prelievo tramite pinzette anatomiche o chirurgiche, in modo tale da non rischiare di distorcere l'istologia dei tessuti prelevati, causando artefatti meccanici.

2.6 STRUMENTARIO

L'atto chirurgico non deve ledere le strutture anatomiche sensibili e deve essere atraumatico in modo da favorire la guarigione dei tessuti coinvolti. Pertanto, la procedura bioptica, deve avvalersi di strumentario di piccole dimensioni, che sia in funzione della zona anatomica da trattare e dalla consistenza di quest'ultima.

Lo strumentario necessario è costituito da [95]:

- Matita dermatografica;

- Strumentario per anestesia;
- Lama bisturi;
- Portalama;
- Pinzette chirurgica ed anatomica;
- Ago e filo di sutura;
- Forbici;
- Pinza emostatica (ad esempio di tipo Mosquito);
- Garza;
- Contenitore ermetico di formalina;
- Carta bibula.

Dopo aver ottenuto il consenso informato, si procede con l'identificazione della zona da cui prelevare il campione. L'utilizzo di una matita dermografica può facilitare il lavoro, poiché permette il riconoscimento del campione da prelevare anche dopo l'anestesia; infatti, il vasocostrittore presente all'interno dell'anestesia può rendere difficile l'individuazione della lesione. L'incisione del bisturi, che deve essere decisa e netta, può percorrere la linea disegnata con la matita dermografica. L'angolo della lama deve essere rivolto lievemente verso la porzione centrale della lesione, al fine di creare un prelievo a forma di cuneo. Successivamente con la pinzetta anatomica o chirurgica si sostiene la parte da asportare e si continua l'incisione verso il tessuto connettivo fino a completa dissezione del pezzo desiderato. Esistono diverse lame chirurgiche, tuttavia le più indicate sono la n. 15, la n. 11 e la n. 12, da scegliere in base alla zona anatomica da raggiungere. Una volta rimosso il campione, è preferibile deporlo su carta bibula o su un frammento di carta assorbente, così da favorirne l'orientamento e facilitare la direzione di taglio nelle fasi successive [96]

CAPITOLO 3: IL PUNTO DI VISTA DEL PATOLOGO ORALE

3.1 INTRODUZIONE

Qualsiasi lesione presente nei tessuti molli del cavo orale persistente da più di due settimane anche dopo la rimozione degli eventuali fattori irritanti dovrebbe essere sottoposta a biopsia, la quale rappresenta il gold standard nella diagnosi di tali lesioni. La biopsia è altrettanto raccomandabile nei casi di lesioni che colpiscono le strutture ossee mascellari, che non possono essere diagnosticate attraverso indagini radiografiche e che siano fonte di sintomatologia per il paziente [97].

Secondo l'Accademia Americana di Patologia Orale e Maxillofacciale, qualsiasi tessuto considerato anormale, prelevato dalla regione orale e maxillofacciale, ad eccezione di alcuni casi (tessuti clinicamente normali, esostosi, tori dentali e polpa dentale rimossa), dovrebbe essere preferibilmente sottoposto all'analisi di uno specialista di patologia orale e maxillofacciale [98]. Pertanto, è buona norma che i tessuti anormali rimossi dal cavo orale siano sottoposti ad analisi istopatologica, a prescindere da quanto il clinico sia sicuro della sua diagnosi.

Dal punto di vista del patologo orale, alle volte può capitare che la diagnosi rischi di essere compromessa a causa di artefatti nel campione di tessuto prelevato, per via di una tecnica bioptica impropria o di un'errata gestione del campione stesso. Risulta quindi necessario evitare qualsiasi anomalia clinica possa presentarsi nel corso delle fasi preoperatoria, operatoria e postoperatoria che possano influire sulla qualità della valutazione istologica e, di conseguenza, che possano sfociare in una diagnosi non corretta [99].

3.2 CONSIDERAZIONI CHIRURGICHE

Nell'esecuzione di una biopsia orale è fondamentale selezionare il sito rappresentativo della lesione e rimuoverne una quantità sufficiente al fine di ottenere un'accurata diagnosi, infatti, i campioni di dimensioni troppo piccole possono rappresentare un problema nella preparazione istologica. Un'ulteriore attenzione è da porre alla soluzione utilizzata per contrassegnare il sito in cui svolgere la procedura biotica. Ad esempio, è sconsigliata la preparazione dell'area con la tintura di iodio e altre soluzioni colorate [100]. Per quanto concerne l'anestesia, questa deve essere somministrata lontano dalla lesione in quanto potrebbe provocare artefatti nel campione. Infine, va posta attenzione nel maneggiare correttamente il tessuto prelevato per evitare di incorporare corpi estranei come cotone o residui di guanti che possano creare artefatti e far apparire l'epitelio come atipico all'esame istologico [101,102].

3.3 TECNICHE PER EVITARE ARTEFATTI

Per ridurre al minimo gli artefatti nei campioni biotici, è importante adottare alcuni accorgimenti tecnici:

- L'uso di strumenti ben affilati è fondamentale per evitare traumi al tessuto e garantire un campione di qualità;
- Non comprimere il tessuto con pinze dentate. Le pinze senza denti rappresentano un'alternativa migliore, così come l'impiego di suture per afferrare il campione;
- Scelta della tecnica di biopsia: la biopsia punch, che consiste nella rimozione di un piccolo cilindro di tessuto, può ridurre gli artefatti rispetto all'uso del bisturi;

- L'uso di elettrobisturi o laser è generalmente sconsigliato poiché questi strumenti generano calore, causando artefatti termici che possono compromettere l'integrità del campione, rendendolo inutilizzabile per scopi diagnostici.

Questi accorgimenti contribuiscono a mantenere l'integrità del tessuto per una diagnosi più accurata [99].

3.4 ORIENTAMENTO

L'orientamento del campione chirurgico, soprattutto nelle biopsie mucose di piccole dimensioni, è fondamentale ai fini diagnostici. Il corretto orientamento, infatti, aiuta il patologo orale a sezionarlo senza svolgere tagli tangenziali, al contrario un orientamento errato consentirà il sezionamento o del dell'epitelio o del tessuto connettivo ma mai di entrambi [99]. Per facilitare l'orientamento, almeno due margini adiacenti devono essere identificati in modo chiaro, ad esempio attraverso l'impiego delle suture. Inoltre, il clinico può fornire al patologo una descrizione scritta del campione in relazione alle suture, nonché, può allegare un'illustrazione. Grazie a queste informazioni del clinico al patologo, sarà possibile valutare i margini del campione (superiore, inferiore, anteriore e posteriore) e verificare l'eventuale presenza di aree che richiedono un ulteriore approfondimento [99].

3.5 PREPARAZIONE E FISSAZIONE

I campioni biotici di piccole dimensioni tendono a deformarsi se non vengono preparati in maniera corretta. Per evitare ciò devono essere posti su di un supporto rigido, ad esempio un pezzo di carta sterile, con la superficie mucosale rivolta verso l'alto.

Successivamente dovranno essere lentamente immersi in formalina, preferibilmente formalina neutralizzata, per essere sottoposti a fissazione [102,103]. Nel caso in cui venga prelevato più di un campione, dovranno essere posti in contenitori diversi, ognuno del quale dovrà avere la propria descrizione [99]. Per quanto riguarda il contenitore del campione, deve essere largo e chiaro in modo da evitare maneggiamenti bruschi del tessuto biotico e in modo tale che si possa vedere il contenuto dello stesso [99].

3.6 INFORMAZIONI AL PATOLOGO

Per ottenere una diagnosi precisa ed esaustiva, è buona norma che il chirurgo fornisca al patologo un modulo contenente le informazioni dettagliate del paziente, dalla storia clinica ai dettagli della lesione. Infatti, una descrizione chiara del tessuto prelevato, con l'aggiunta di immagini può agevolare il lavoro del patologo e migliorare l'accuratezza della diagnosi [99].

CAPITOLO 4: TECNICHE BIOPTICHE INNOVATIVE

4.1 INTRODUZIONE

Il carcinoma orale è caratterizzato da uno sviluppo insidioso e da una diagnosi difficile, spesso tardiva e associata alla presenza di metastasi. Ad oggi, l'ispezione del cavo orale e la biopsia chirurgica rimangono il gold standard per la diagnosi del carcinoma orale e delle lesioni potenzialmente maligne ma va ricordato che queste procedure sono ritenute invasive e talvolta possono essere associate ad alcune morbilità [104,105]. Inoltre, molti professionisti eseguono la biopsia solamente in lesioni che mostrano segni clinici di malignità [105] ed è stato documentato, attraverso uno studio negli USA, che le lesioni selezionate come sospette da parte dei clinici erano spesso associate ad un basso tasso di sensibilità e specificità. Si stima infatti che fino al 40% dei casi di carcinoma orale non venga adeguatamente intercettato dalle tecniche bioptiche nella pratica clinica quotidiana [106].

L'approccio attuale consiste nella diagnosi precoce delle lesioni orali potenzialmente maligne (OPMD) per migliorare la prognosi del paziente e, oltre all'ispezione visiva e tattile del cavo orale sono state proposte tecniche complementari innovative volte ad aumentare l'accuratezza diagnostica [107]. Tra le innovazioni attualmente più rilevanti troviamo la punch biopsy, già molto impiegata nelle biopsie di altri distretti corporei come la cute, il laser e la più recente brush biopsy.

4.2 PUNCH BIOPSY

Attualmente, la biopsia punch sta diventando sempre più popolare in ambito odontoiatrico, rappresentando di fatto un metodo semplice ed efficace per ottenere un campione rappresentativo di tessuto orale da sottoporre ad analisi istopatologica [99]. La biopsia punch prevede l'utilizzo di un apposito strumento, costituito da una lama cilindrica con un diametro da 2 a 8 mm con incrementi gradualmente, fissata su di un manico di plastica, in grado di rimuovere un nucleo di tessuto generalmente di 4 mm (Figura 12) [97].

Entrambi i tipi di biopsia, sia escissionale che incisionale, possono essere eseguiti con questo particolare strumento: il bisturi punch, o bisturi circolare. Ci si può avvalere di tale strumento per biopsie incisionali ed escissionali di piccole dimensioni, situate in aree accessibili che permettano l'inserimento perpendicolare dello strumento. È possibile eseguire la punch biopsy in tutto il cavo orale, tuttavia, è particolarmente utilizzata per le lesioni riscontrate sul palato.

La procedura da seguire per una biopsia col punch prevede:

1. Selezionare il sito della biopsia e demarcarlo con l'ausilio di coloranti o di una penna dermografica;
2. Eseguire l'anestesia locale;
3. Determinare il volume del campione da prelevare (deve essere almeno 6 mm di diametro e 5 mm di profondità);
4. Inserire il bisturi con movimento rotatorio fino a raggiungere la profondità necessaria e successivamente rimuoverlo (Figura 13);

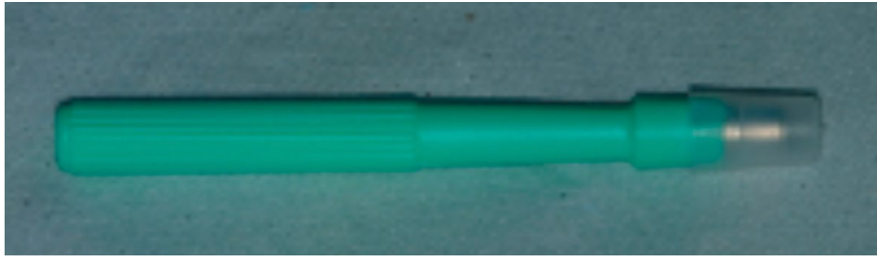


Figura 112. *Bisturi punch (Fonte: IL CARCINOMA ORALE a cura di Lorenzo Lo Muzio).*



Figura 123. *Biopsia eseguita con il bisturi punch (Fonte: IL CARCINOMA ORALE a cura di Lorenzo Lo Muzio).*

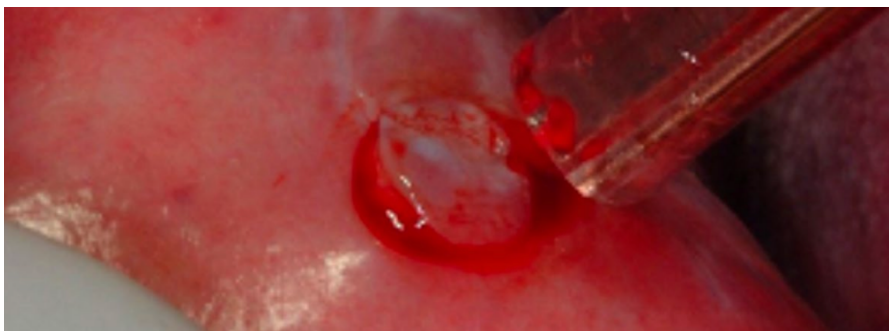


Figura 14. *Aspetto clinico dopo punch biopsy (Fonte: IL CARCINOMA ORALE a cura di Lorenzo Lo Muzio).*

Dopo la rimozione del bisturi, si osserva clinicamente un gettone di tessuto che emerge dal piano mucoso (Figura 14), che verrà prima estratto con una pinzetta anatomica e poi sezionato e deposto su un frammento di carta bibula.

Per concludere è stato visto che questo tipo di biopsia possiede una bassa probabilità di indurre artefatti, anche rispetto alle tecniche bioptiche tradizionali [99], risultando così un'alternativa efficace alle biopsie incisionali ed escissionali eseguite con il classico bisturi chirurgico.

4.3 BRUSH BIOPSY

Le moderne tecniche di citologia orale (OBC), rappresentano da oltre un decennio un'area di forte interesse sperimentale e presentano un elevato potenziale come strumento ausiliare nelle diagnosi di carcinoma orale [108]. Il metodo OBC è un approccio miniminvasivo e sicuro per la raccolta di cellule della mucosa orale, attraverso cui si ottengono campioni di cellule epiteliali della mucosa orale [108,109].

Questa tecnica prevede l'utilizzo di un apposito spazzolino (Figura 15), il quale, attraverso uno specifico movimento di rotazione, permette di staccare singole cellule dal tessuto di origine e trasferirle su un vetrino citologico per poi essere sottoposte all'esame microscopico (Figure 16-18) [110].



Figura 15. Brush Biopsy [Fonte: F.W. Neumann et al. Clinical Oral Investig.2022;26(11)]

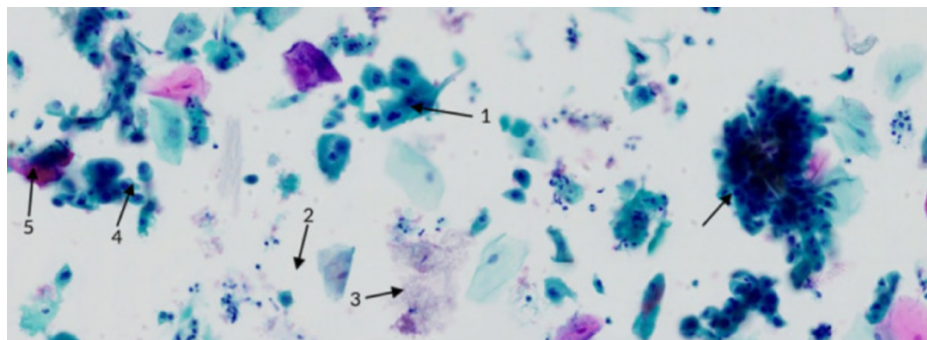


Figura 16. Sospette cellule tumorali: Atipia dei nuclei (1). Contorno del nucleo irregolare (2). Nucleolo opaco a causa di picnosi atipica (3). Figura mitotica atipica (4). [Fonte: F.W. Neumann et al. Clinical Oral Investig.2022;26(11)].

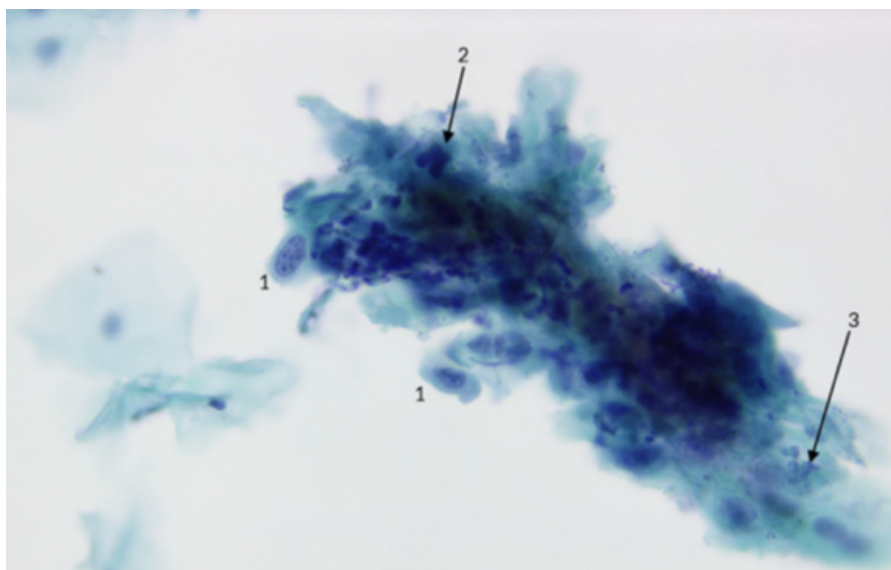


Figura 17. Cellule dubbie: cellule con lievi schiarimenti perinucleari (1). Qualche differenza nella forma, dimensione e colorazione dei nucleoli (2). Polimorfismo che infiltra l'epitelio squamoso (3). Ramificazioni ed ife di *Candida Albicans* (4). [Fonte: Fonte: F.W. Neumann et al. *Clinical Oral Investig.*2022;26(11)].

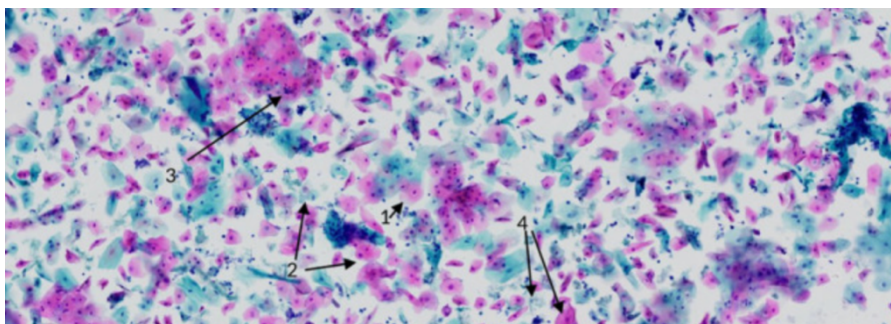


Figura 18. Negativo per cellule tumorali: lo sfondo è chiaro, le cellule squamose appaiono normali, i nuclei sono piccoli e c'è una minima variazione nella forma. [Fonte: Fonte: F.W. Neumann et al. *Clinical Oral Investig.*2022;26(11)].

OralCDx

Grazie all'introduzione della citologia liquida (LBC), dell'analisi computerizzata e delle analisi molecolari accessorie, negli ultimi anni è migliorata l'accuratezza dell'analisi citologica. Un dispositivo progettato per questo tipo di procedura è l'OralCDx, il quale permette di svolgere una "biopsia transepiteliale" orale computer assistita, ed è in grado di diagnosticare i casi di carcinoma orale [111]. Questa tecnica prevede l'utilizzo di uno spazzolino di nylon, necessario alla raccolta di cellule dell'area anatomica da sottoporre ad analisi, che saranno poi fissate su di un vetrino per poi essere sottoposte a colorazione con il test di Papanicolau modificato. Infine, verranno acquisite le immagini da analizzare tramite la scansione computer assistita. Le immagini rilevate saranno analizzate da un apposito programma di elaborazione dati su base neurale, in grado di rilevare le cellule cancerose e precancerose e verranno classificate in base al grado di atipia in base alla cheratinizzazione e alle variazioni morfologiche [111]. A questo punto sarà il patologo ad analizzare le immagini acquisite e in base a ciò che osserverà nel campione selezionato potrà ritenerlo: negativo (benigno), positivo (carcinoma o presenza di displasia epiteliale) o atipico (cambiamento anormale dell'epitelio, incertezza diagnostica) [111]. In presenza di campioni contenenti cellule anormali, con sospetto neoplastico, verranno inviate le immagini al clinico insieme ad una relazione redatta dal patologo in cui si raccomanda la conferma della diagnosi tramite biopsia chirurgica.

Nonostante le prospettive di miglioramento del normale flusso di lavoro, il più grande limite di questa tecnica di brush biopsy è rappresentato dalla presenza di falsi negativi, i quali potrebbero essere ridotti abbinandola ad ulteriori tecniche come, ad esempio, l'analisi del DNA nucleare, le mutazioni del gene p53, alterazioni epigenetiche.

In conclusione, sebbene la biopsia chirurgica tradizionale rimanga il gold standard per la diagnosi definitiva, numerosi studi hanno dimostrato il potenziale di tecniche diagnostiche meno invasive come la brush biopsy, soprattutto se integrata alle nuove tecnologie a disposizione [112]. Approcci minimamente invasivi come questo, non solo permetterebbero la diagnosi del carcinoma squamocellulare orale ma, allo stesso tempo, faciliterebbero il monitoraggio delle lesioni orali potenzialmente maligne [112]. Alla luce di quanto esposto, la brush biopsy e le tecnologie ad essa correlate sono degli strumenti promettenti da affiancare alle tecniche biottiche tradizionali e il loro impiego nella pratica clinica potrebbe comportare progressi significativi nella diagnosi e nella gestione del carcinoma orale [112]. Tuttavia, nonostante i risultati promettenti, sono raccomandati ulteriori studi al fine di garantire diagnosi sempre più precise e ridurre il numero di falsi positivi o negativi [112].

4.4 BIOPSIA CON LASER

Negli ultimi 30 anni il laser è stato ampiamente utilizzato come strumento di incisione nella chirurgia orale. Ad oggi, nel campo della medicina orale, ne esistono tipi diversi che variano in base al mezzo attivo, alla lunghezza d'onda, alla potenza e agli effetti biologici prodotti. I tipi di laser attualmente impiegati sono: laser a diodo, laser a CO₂, laser Nd, laser Er, laser Er,Cr e laser KTP [113].

L'utilizzo del laser al posto del bisturi nelle biopsie orali presenta dei vantaggi, tra cui l'effetto coagulativo, la capacità di indurre emostasi nel sito trattato, un basso rischio infettivo, non richiede l'impiego di suture, presenta un basso grado di infiammazione e dolore, favorendo così la guarigione della ferita [114]. D'alto canto il laser, oltre ad essere

uno strumento costoso, ha lo svantaggio di poter indurre danno termico, con il conseguente rischio di danneggiare il tessuto prelevato; inoltre, non è adatto a tutti i tipi di lesioni riscontrabili all'interno dei tessuti molli del cavo orale [114].

Nella scelta del laser, è importante considerare che tipo di interazione avrà il suo raggio con i tessuti target: infatti, ogni lunghezza d'onda ha una specifica affinità con i cromofori tissutali umani, come la melanina, l'emoglobina, l'acqua e l'idrossiapatite, in grado di assorbire determinate radiazioni dello spettro elettromagnetico [113]. La capacità di eseguire un taglio invece si basa sull'effetto fototermico; avviene quindi un'interazione tra i cromofori tissutali che portano al riscaldamento e alla vaporizzazione dei tessuti bersaglio fino alla completa dissezione del tessuto stesso [113]. È proprio quest'ultimo meccanismo il responsabile dell'effetto termico ai margini del campione [115], che talvolta può causare danni nel tessuto connettivo [115-120].

Altri fattori essenziali da tenere in considerazione nella scelta del dispositivo sono anche la potenza e la lunghezza d'onda. Infatti, un laser con una potenza insufficiente non sarebbe in grado di avviare l'ablazione dei tessuti molli, mentre invece un laser con una potenza troppo elevata rischierebbe di causare danni termici e artefatti istologici, compromettendo la diagnosi [115,116,118,121-124].

La preoccupazione maggiore sull'utilizzo dei dispositivi laser riguarda il rischio di quest'ultimi di provocare danni tissutali [114]. In letteratura sono stati descritti diversi tipi di artefatti istologici derivanti dall'utilizzo di questa tecnologia [114,115,118,125-128] tra cui: iperplasia pseudoepiteliomatosa [129], alterazioni pseudodisplastiche dell'epitelio [128,130] e vescicole nello strato epiteliale [115,118,128,131]. Questi artefatti rischiano di compromettere la diagnosi durante la valutazione istologica delle alterazioni displastiche del campione tissutale prelevato [114].

Una revisione sistematica a cura di Lopes-Santos et al. ha esaminato i danni istologici causati dai laser ad alta potenza rispetto ai tradizionali bisturi nelle biopsie orali ed è stato constatato che l'impiego del laser comporta la presenza di almeno un artefatto istologico considerando tutti i casi esaminati. Tra gli artefatti più comunemente riscontrati troviamo: la perdita di adesioni intraepiteliali e subepiteliali, i cambiamenti a livello nucleare come nuclei fusiformi o ipercromatici e pirocitosi, ed artefatti mesenchimali come carbonizzazione dei tessuti marginali. Sono stati riscontrati anche artefatti vascolari come collasso dei vasi sanguigni e trombosi [114]. L'accuratezza dei margini chirurgici è risultata inferiore nel laser rispetto al bisturi tradizionale; infatti, le incisioni apparivano meno precise e regolari [114].

In conclusione, i laser ad alta potenza sono un'alternativa pratica nella biopsia delle lesioni del cavo orale, tuttavia va sottolineata l'importanza di rispettare i criteri di idoneità e le adeguate indicazioni all'uso di tali dispositivi per ridurre il rischio di incorrere in artefatti che potrebbero compromettere la correttezza della diagnosi istopatologica. Allo stesso tempo i patologi devono essere a conoscenza degli eventuali artefatti citologici, nonché dei possibili danni alla struttura tissutale, che possono essere provocati dal laser, al fine di evitare diagnosi sbagliate, quindi trattamenti non adeguati al paziente [114].

Altri studi raccomandano l'estensione dei margini durante le procedure biotiche eseguite con laser, altri ancora ne suggeriscono l'uso solamente in presenza di lesioni non sospette proprio a causa della possibile difficoltà di valutare il grado di displasia ai margini chirurgici [113].

Ad ogni modo sono necessari ulteriori studi, con approccio standardizzato, per stabilire un protocollo standard e i parametri ottimali per l'uso dei vari tipi di laser nelle biopsie orali [113].

BIBLIOGRAFIA

1. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma- -an update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401–21.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5): E359–86.
3. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, *et al.*, editors. *Cancer incidence in five continents, vol. X.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014
4. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.*2014;50(5):387–403.
5. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 05/05/2016. [Internet]. 2013.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.*2016;66(1):7– 30.
7. Torre LA, Sauer AM, Chen MS Jr, Kagawa-Singer M, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: converging incidence in males and females. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(3):182–202.
8. Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, *et al.* Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCEconsortium. *Int J Epidemiol.* 2015;44(1):169–85.

9. Gillison ML: Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007, 29:779-792.
10. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C: Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005, 41:244- 260.
11. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988, 48:3282-3287.
12. Moreno-Lopez LA, Esparza- Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez- Hernandez MJ, Dominguez- Rojas V: Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a casecontrol study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000, 36:170-174.
13. Silverman S, Jr., Griffith M: Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1972, 85:637-640.
14. Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC: Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer* 1977, 40:1872-1878.
15. Neville BW, Day TA: Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002, 52:195- 215.
16. Rodu B, Jansson C: Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15:252-263.
17. Warnakulasuriya S: Smokeless tobacco and oral cancer. *Oral Dis* 2004, 10:1-4.
18. Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS: Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *J Oral Pathol Med* 1995, 24:145-152.

19. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS: Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *CommunityDent Oral Epidemiol* 1985, 13:340-341.
20. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist LE: Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population- based case-referent study inSweden. *Cancer* 1998, 82:1367-1375.
21. 50. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, et al: The role of type of tobacco and typeof alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004, 108:741-749.
22. Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P: Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 1997, 20:146-150.
23. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C: Risk factors for oraland pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 1999, 35:375-378.
24. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P: Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a casecontrol study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995, 31B:301-309.
25. Ng SK, Kabat GC, Wynder EL: Oral cavity cancer in non-users of tobacco. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:743-745.
26. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C: Risk factors for oraland pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 1999, 35:375-378.
27. Boffetta P, Hashibe M: Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006, 7:149-156.
28. Wight AJ, Ogden GR: Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol* 1998, 34:441-447.

29. Ogden GR: Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 2005, 35:169- 173.
30. Vaca CE, Nilsson JA, Fang JL, Grafstrom RC: Formation of DNA adducts in human buccal epithelial cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro. *Chem Biol Interact* 1998, 108:197-208.
31. Leo MA, Lieber CS: Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr* 1999, 69:1071-1085.
32. Serpico R, Liguori G: *La candidosi orali: clinica, diagnosi e terapia*. Padova: PiccinNuova Libreria; 2000.
33. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I: A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 84:1111-12.
34. O'Grady JF, Reade PC: Candida albicans as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis* 1992, 13:783-786.
35. Field EA, Field JK, Martin MV: Does Candida have a role in oral epithelial neoplasia *J Med Vet Mycol* 1989, 27:277-294.
36. Walker DM, Arendorf TM: Candidal leucoplakia, chronic multifocal candidosis and median rhomboid glossitis. . In *Oral candidosis*. Edited by Ltd BC. London: Samaranayake LP, Mac Farlane TW; 1990: 184-199
37. Miller CS, Johnstone BM: Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001, 91:622-635.

38. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J: Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991, 12:1627-1631.
39. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF: Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998, 20:250-265.
40. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J: Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983, 12:418-424.
41. Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE, Stoner GD: Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 83:471-477.
42. Shin KH, Min BM, Cherrick HM, Park NH: Combined effects of human papillomavirus-18 and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the transformation of normal human oral keratinocytes. *Mol Carcinog* 1994, 9:76-86.
43. Sugerman PB, Shillitoe EJ: The high risk human papilloma viruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997, 3:130-147.
44. Hermann RM, Fuzesi L, Pradier O, Christiansen H, Schmidberger H: Presence of human papillomavirus-18 and Epstein-Barr virus in a squamous cell carcinoma of the tongue in a 20-year-old patient. Case report and review of the current literature. *Cancer Radiother* 2004, 8:262-265.
45. Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, Meijer CJ: No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000, 86:356-361.

46. Jaber MA, Porter SR, Bain L, Scully C: Lack of association between hepatitis C virus and oral epithelial dysplasia in British patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003, 32:181- 183.
47. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C: Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2000, 86:122127.
48. De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H: Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-- II. Nutrients. *Oral Oncol* 1999, 35:22-26.
49. Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Talamini R, Barbone F, Herrero R, Franceschi S: Diet and risk of oral and pharyngeal cancer. An Italian case-control study. *Eur J Cancer Prev* 2001, 10:191- 195.
50. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikollajczak A, Zatonski W, Herrero R, Munoz N, Franceschi S: Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2003, 12:25-33.
51. Franceschi S, Levi F, Conti E, Talamini R, Negri E, Dal Maso L, Boyle P, Decarli A, La Vecchia C: Energy intake and dietary pattern in cancer of the oral cavity and pharynx. *Cancer Causes Control* 1999, 10:439-444.
52. Franceschi S, Favero A, Conti E, Talamini R, Volpe R, Negri E, Barzan L, La Vecchia C: Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx. *Br J Cancer* 1999, 80:614-620.
53. Neville BW, Day TA: Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002, 52:195- 215.
54. Jessner W, Vogelsang H, Puspok A, Ferenci P, Gangl A, Novacek G, Bodisch A, Wenzl E: Plummer- Vinson syndrome associated with celiac disease and complicated

- by postcricoid carcinoma and carcinoma of the tongue. *Am J Gastroenterol* 2003, 98:1208- 1209.
55. Greenberg MS, Glick M, Ship JA: *Burket's Oral medicine*. 11th edn. Hamilton: BCDecker; 2008.
56. Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, Munoz N, Franceschi S: Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer* 2000, 83:1238-1242.
57. Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP: Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tractcancer. *Oral Oncol* 1998, 34:284-291.
58. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK: *Oral pathology - clinical pathological*
59. *correlations*. 4th edn. St. Louis: Saunders; 2003.
60. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE: *Oral and maxillofacial pathology*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders; 2002
61. Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, et al: Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997, 336:897-904.
62. Scheifele C, Reichart PA, Hippler- Benseidit M, Neuhaus P, Neuhaus R: Incidence of oral, pharyngeal, and laryngeal squamous cell carcinomas among 1515 patientsafter liver transplantation. *Oral Oncol* 2005, 41:670-676.
63. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL: Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: acase-control study. *Int J Cancer* 1995, 63:769- 773.

64. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, 121:157-160.
65. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA: Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *Bmj* 1996, 313:716-721.
66. Bongers V, Braakhuis BJ, Tobi H, Lubsen H, Snow GB: The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, 5:595-598.
67. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953, 6:963-968.
68. Hoffman GR, Hayter JP: Widespread subcutaneous distant metastases from a head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002, 60:954-958.
69. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR: Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000, 110:397-401.
70. Connelly ST, Schmidt BL: Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Pain* 2004, 5:505-510.
71. Lip and oral cavity. In *AJCC cancer staging manual - sixth edition*. 6th edition. Edited by Green FG, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. New York: Springer Verlag; 2002: 23-32
72. Barthélémy I, Sannajust JP, Revol P, Mondié JM: Oral cancer. Preamble, epidemiology, clinical study. *EMC-Stomatologie* 2005, 1:277-294.

73. Connelly ST, Schmidt BL: Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Pain* 2004, 5:505-510.
74. Ferlito A, Robbins KT, Medina JE, Shaha AR, Som PM, Rinaldo A: Is it time to eliminate confusion regarding cervical lymph node levels according to the scheme originated at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center? *Acta Otolaryngol* 2002,122:805-807.
75. Woolgar JA: Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/ oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999, 37:175-180.
76. Sano H, Nitta M, Nakayama M, Yao K, Nagai H, Makoshi T, Inagi K, Takahashi H, Okamoto M: Clinical review of autopsy cases that succumbed to head and neck malignancies. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002:64-66.
77. Shah JP: *Cancer of the Head and Neck*. London: BC Decker Inc Hamilton; 2001.
78. Gnepp DR: *Diagnostic surgical pathology of the head and neck*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2001.
79. Prince S, Bailey BM: Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999, 37:164-174.
80. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 3rd edn. New York: Mosby; 1999.
81. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT: Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol HeadNeck Surg* 1998, 124:637- 640.
82. Bryne M, Jenssen N, Boysen M (1995). Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 427: 277-281.

83. Zidar N, Gale N, Kambic V, Fischinger J (2001). Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 21: 451-454.
84. Mallofre C, Cardesa A, Campo E, Condom E, Palacin A, Garin-Chesa P, Traserra J (1993). Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract* 189: 275-282
85. van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ruiter DJ, Ramaekers CS, Kuijpers W (1997). Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 376-383.
86. Ghadially FN (1985). *Diagnostic Electron Microscopy of Tumours*. 2nd ed. Butterworths: London.
87. Groome PA, Schulze K, Boysen M, Hall SF, Mackillop WJ: A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* 2001, 23:613- 624.
88. Davari P, Fazel N. *Practical pearls for oral procedures*. *Clin Dermatol*. luglio 2016;34(4):440-8.
89. Farah C, McCullough M. *Oral cancer awareness for the general practitioner: new approaches to patient care*. *Aust Dent J*. marzo 2008;53(1):210.
90. Oliver RJ, Sloan P, Pemberton MN. *Oral biopsies: methods and applications*. *Br Dent J*. marzo 2004;196(6):329-33.
91. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. *Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer*

- eighth edition cancer staging manual: Head and Neck Cancers-Major 8th Edition Changes.* CA Cancer J Clin. marzo 2017;67(2):122-37.
92. Poh CF. *Biopsy and Histopathologic Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions.* 2008;74(3):6.
93. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. *Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies.* J Oral Pathol Med. Marzo 2016;45(3):155-66.
94. Kumaraswamy K, Rao P, Vidhya M, Mukunda A. *Oral biopsy: Oral pathologist's perspective.* J Cancer Res Ther. 2012;8(2):192.
95. Avon S-L, Klieb HBE. *Oral soft-tissue biopsy: an overview.* J Can Dent Assoc. 2012;78:c75.
96. Masthan KMK. *How to Help the Oral Pathologist in Making an Accurate Diagnosis.* J Clin Diagn Res. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2013 January, Vol-7(1): 181-184.
97. Mota-Ramírez A, Silvestre FJ, Simó JM. *Oral biopsy in dental practice.* Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2007;12: E50410.
98. Tissue submission policy Available from: <http://www.aaomp.org/general/tissue.htm>
99. Kumaraswamy, K. L., Vidhya, M., Rao, P. K., & Mukunda, A. (2012). Oral biopsy: Oral pathologist's perspective. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8(2), 192-198.
100. Melrose RJ, Handlers JP, Kerpel S, Summerlin DJ, Tomich CJ. *The use of biopsy in dental practice. The position of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology.* Gen Dent 2007; 55:457-61.

101. Lovas GL, Howell RE, Peters E, Gardner DG. Starch artifacts in oral cytologic specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60:195-6.
102. Krishnanand PS, Kamath VV, Nagaraja A, Badnia M. Artefacts in Oral Mucosal Biopsies – A Review. *J Orofac Sci* 2010; 2:57-62.
103. Rosebush MS, Anderson KM, Rawal SY, Mincer HM, Rawal YB. The oral biopsy: indications, techniques and special considerations. *J Tenn Dent Assoc* 2010; 90:17-20.
104. Yang E, Tan M, Schwarz R, Richards-Kortum R, Gillenwater A, Vigneswaran N. Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*.2018;125(6):670-681
105. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc*.1999;130(10):1445-1457.
106. Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, et al. Oral leukoplakia and risk of progression to oral cancer: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst*.2020;112(10):1047-1054.
107. Idee M, Farah CS, Kujan O. Oral brush biopsy using liquid-based cytology is a reliable tool for oral cancer screening: A cost-utility analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2020;129(3):213-220.
108. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dys-plasia: recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*. 2021;27(8):1947–1976.

109. Idrees M, Farah CS, Sloan P, Kujan O. Oral brush biopsy using liquid-based cytology is a reliable tool for oral cancer screening: A cost-utility analysis. *Cancer Cytopathol.* 2022;130(12):740-748. doi: 10.1002/cncy.22501.
110. Goodson ML, Smith DR, Thomson PJ. Efficacy of oral brush biopsy in potentially malignant disorder management. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(10):896-901. doi: 10.1111/jop.12627.
111. Patton LL1, Epstein JB, Kerr AR. Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 2008;139(7):896-905.
112. Alsarraf, A. H., Kujan, O., & Farah, C. S. (2018). The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(2), 104–116.
113. Tenore G, Mohsen A, Nuvoli A, Palaia G, Rocchetti F, Di Gioia CRT, Cicconetti A, Romeo U, Del Vecchio A. The Impact of Laser Thermal Effect on Histological Evaluation of Oral Soft Tissue Biopsy: Systematic Review. *Photomed Laser Surg.* 2023;41(1):53-61. doi:10.1089/pho.2022.0065.
114. Lopes-Santos G, Peralta-Mamani M, Oliveira DT. Histological implications of high-power laser use in the oral soft tissue lesions: a systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2020;49(1):23-30. doi: 10.1111/jop.12910.
115. Monteiro L, Delgado ML, Garcês F, Machado M, Ferreira F, Martins M, Salazar F, Pacheco JJ (2019) A histological evaluation of the surgical margins from human oral fibrous-epithelial lesions excised with CO2 laser, Diode laser, Er:YAG laser, Nd:YAG laser, electrosurgical scalpel and cold scalpel. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 24: e271–e280.

116. Suter VGA, Altermatt HJ, Bornstein MM (2020) A randomized controlled trial comparing surgical excisional biopsies using CO₂ laser, Er:YAG laser and scalpel. *Int J Oral Maxillofac Surg* 49:99–106.
117. Bhatsange A, Meshram EP, Waghmare A, Shiggaon L, Mehetre V, Shende A (2016) A clinical and histological comparison of mucosal incisions produced by scalpel, electrocautery, and diode laser: a pilot study. *J Dental Lasers* 10:37
118. Lopes-Santos G, da Silva Santos PS, Oliveira DT (2023) Cytological artifacts mimicking vulgar pemphigus caused by diode laser surgery in oral lesion. *Int J Surg Pathol* 31(7):1323–1325.
119. Vescovi P, Corcione L, Meleti M, Merigo E, Fornaini C, Manfredi M, Bonanini M, Govoni P, Rocca JP, Nammour S (2010) Nd:YAG laser versus traditional scalpel. A preliminary histological analysis of specimens from the human oral mucosa. *Lasers Med Sci* 25:685–691
120. Amaral MBF, de Ávila JMS, Abreu MHG, Mesquita RA (2015) Diode laser surgery versus scalpel surgery in the treatment of fibrous hyperplasia: a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44:1383–1389.
121. Cercadillo-Ibarguren I, España-Tost A, Arnabat-Domínguez J, Valmaseda-Castellón E, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C (2010) Histologic evaluation of thermal damage produced on soft tissues by CO₂, Er,Cr:YSGG and diode lasers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15.
122. Angiero F, Parma L, Crippa R, Benedicenti S (2012) Diode laser (808 nm) applied to oral soft tissue lesions: a retrospective study to assess histopathological diagnosis and evaluate physical damage. *Lasers Med Sci* 27:383–388.

123. Merigo E, Clini F, Fornaini C, Oppici A, Paties C, Zangrandi A, Fontana M, Rocca JP, Meleti M, Manfredi M, Cella L, Ves-covi P (2013) Laser-assisted surgery with different wavelengths: a preliminary ex vivo study on thermal increase and histological evaluation. *Lasers Med Sci* 28:497–504
124. Parker S (2007) Lasers and soft tissue: “loose” soft tissue surgery. *Br Dental J* 202(4):185–191.
125. Azevedo AS, Monteiro LS, Ferreira F, Delgado ML, Garcês F, Carreira S, Martins M, Suarez-Quintanilla J (2016) In vitro histological evaluation of the surgical margins made by different laser wavelengths in tongue tissues. *J Clin Exp Dent* 8:e388.
126. Jin JY, Lee SH, Yoon HJ (2010) A comparative study of wound healing following incision with a scalpel, diode laser or Er,Cr:YSGG laser in guinea pig oral mucosa: a histological and immunohistochemical analysis. *Acta Odontol Scand* 68:232–238.
127. Romeo U, Libotte F, Palaia G, del Vecchio A, Tenore G, Visca P, Nammour S, Polimeni A (2012) Histological in vitro evaluation of the effects of Er:YAG laser on oral soft tissues. *Lasers Med Sci* 27:749–753.
128. Gill K, Sandhu SV, Sethi N, Bhandari R (2021) Biopsy of oral soft tissue lesions by 808 nm and 980 nm diode laser: a morphological and histochemical evaluation. *Lasers Dent Sci* 5:207–222.
129. Seoane J, González-Mosquera A, García-Martín JM, García-Caballero L, Seoane-Romero JM, Varela-Centelles P (2015) Pseudoepitheliomatous hyperplasia after diode laser oral surgery. An experimental study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20:e554.

130. Seoane J, Caballero TG, Urizar JMA, Almagro M, Mosquera AG, Varela-Centelles P (2010) Pseudodysplastic epithelial artefacts associated with oral mucosa CO2 laser excision: an assessment of margin status. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39:783–787.
131. Vescovi P, Corcione L, Meleti M, Merigo E, Fornaini C, Manfredi M, Bonanini M, Govoni P, Rocca JP, Nammour S (2010) Nd:YAG laser versus traditional scalpel. A preliminary histological analysis of specimens from the human oral mucosa. *Lasers Med Sci* 25:685–691.