SOMMARIO

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE 2
1.1 Il carcinoma del cavo orale: 2
1.1.1 Epidemiologia 3
1.1.2 Fattori di rischio 8
1.1.3 Caratteristiche cliniche 16
1.1.4 Sedi Anatomiche 22
1.1.5 Grading Istologico 27
1.1.6 Staging TNM 30

1.2 Il Budding Tumorale: 33
1.2.1 Introduzione 33
1.2.2 Definizione 34
1.2.3 Valutazioni Istopatologiche 36
1.2.4 Il Valore Prognostico del TB 45

CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO 50

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI 51
3.1 Selezione dei pazienti 51
3.2 Valutazione istologica e proposta di grading 52

CAPITOLO 4: RISULTATI 54
4.1 Dati clinico-patologici 54
4.2 Analisi univariata di sopravvivenza e recidiva 58
4.3 Analisi multivariata di sopravvivenza e recidiva 63

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE 65

BIBLIOGRAFIA 71

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1. IL CARCINOMA DEL CAVO ORALE

Il carcinoma squamo-cellulare del cavo orale (OSCC) è la forma più comune di neoplasia del cavo orale [1]. Il OSCC è responsabile di più del 90% dei casi di cancro del cavo orale e ha il più alto tasso di mortalità al mondo [1,2]. In particolare, si stimano circa 354.846 nuovi casi e 177.384 morti nell'anno 2018 a livello mondiale [3].

L'incidenza di questa lesione è in continuo aumento, coinvolgendo sempre più soggetti giovani [2,4]. Nelle popolazioni occidentali il fattore eziologico più comune è il consumo di tabacco e alcool, mentre nelle popolazioni orientali, in particolari modo in India, è rappresentato dall'abitudine di masticare misture a base di tabacco e Noci di Areca o Betel.

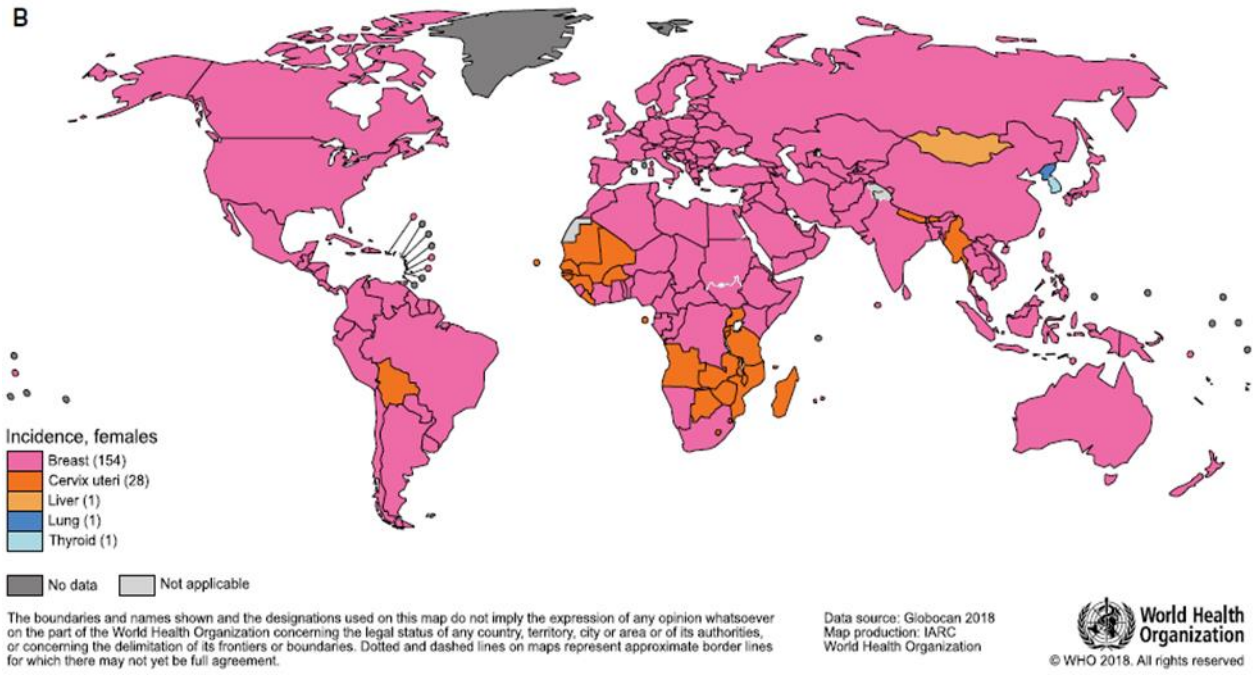
L'OSCC può colpire numerose strutture anatomiche, nello specifico: le labbra, la lingua, la gengiva, il trigono retromolare, il tetto e il pavimento del cavo orale, la mucosa vestibolare e l'orofaringe [1,5]. Le sedi di maggior coinvolgimento comprendono il bordo laterale della lingua, la quale rappresenta uno dei siti peggiori in termini di prognosi, seguita dal pavimento del cavo orale e il labbro inferiore [1,5].

La presenza di disordini potenzialmente maligni (la leucoplachia, l'eritroplachia, Lupus Eritematoso Discoide, il lichen planus orale, la fibrosi submucosa e la cheilite attinica) è associata ad una maggiore probabilità di sviluppare OSCC, dal momento che la loro presenza aumenta la probabilità di una trasformazione maligna [1].

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Il carcinoma del cavo orale è il carcinoma più ampiamente diffuso nei paesi in via di sviluppo ma è stato notato un cambiamento del trend nella prevalenza di questa patologia nei Paesi occidentali, dovuto cambiamenti nello stile di vita [6]. È di rilevante importanza descrivere la sua distribuzione per facilitare e implementare protocolli di prevenzione e controllo.

La posizione geografica, lo status socioeconomico, influenzano il rischio di manifestazione dell'OSCC. Infatti, secondo le stime del WHO datate 2018, l'OSCC tende a concentrarsi in regioni definite *ad alto rischio*: in paesi dei Sud Asia (come India, Sri Lanka, Pakistan e Bangladesh) e le Isole del Pacifico (Papua Nuova Guinea, dove ha il più alto tasso di incidenza al mondo, per ambo i sessi) l'OSCC rappresenta la forma più comune di cancro, contribuendo quasi al 25% di tutti i nuovi casi [6], con una preponderanza maggiore generalmente negli uomini rispetto alle donne [3,7].



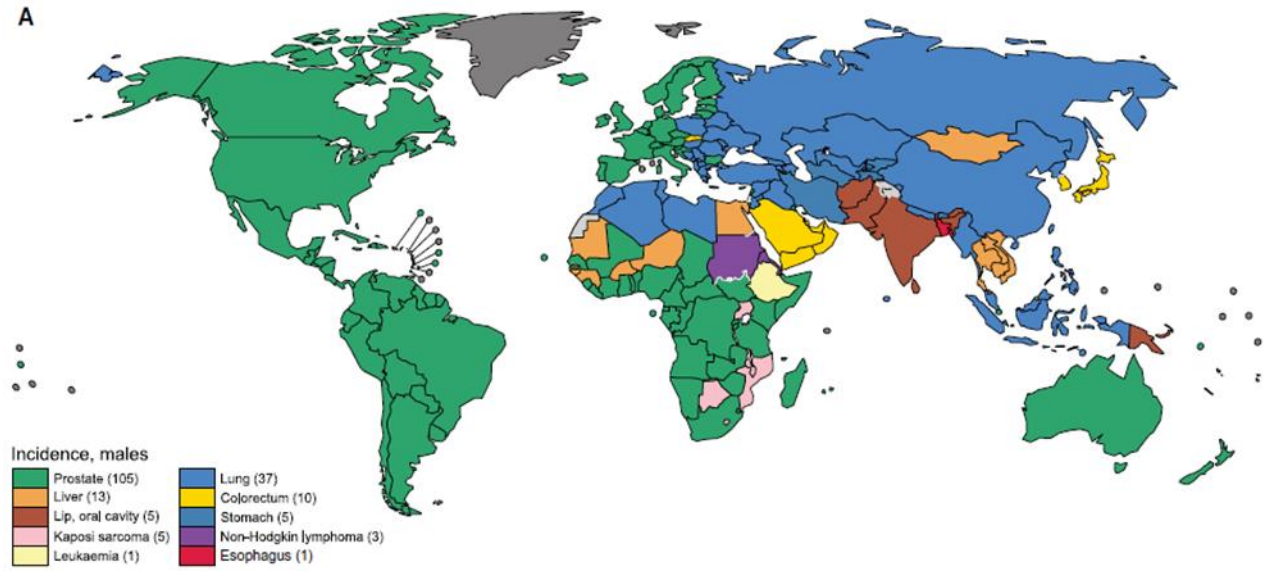
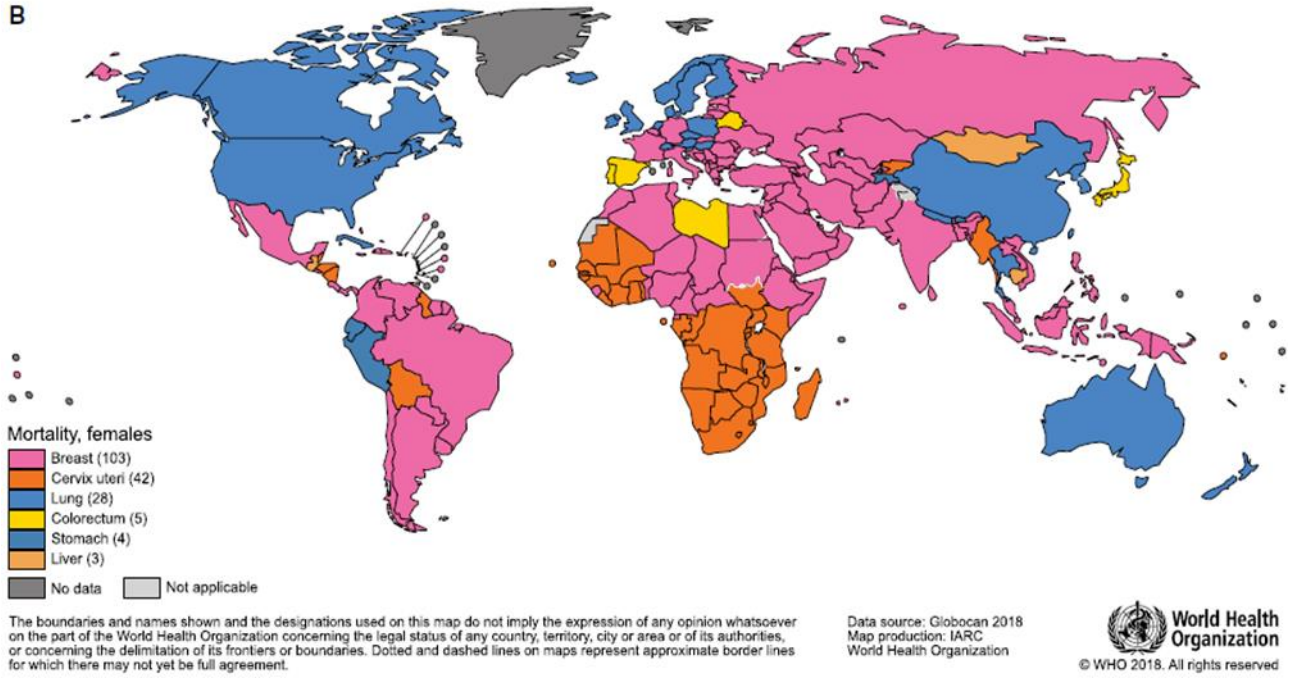


Figura 1-2. Incidenza globale dei più comuni tipi di carcinoma in ogni Paese tra maschi (A) e femmine (B). GLOBOCAN 2018.



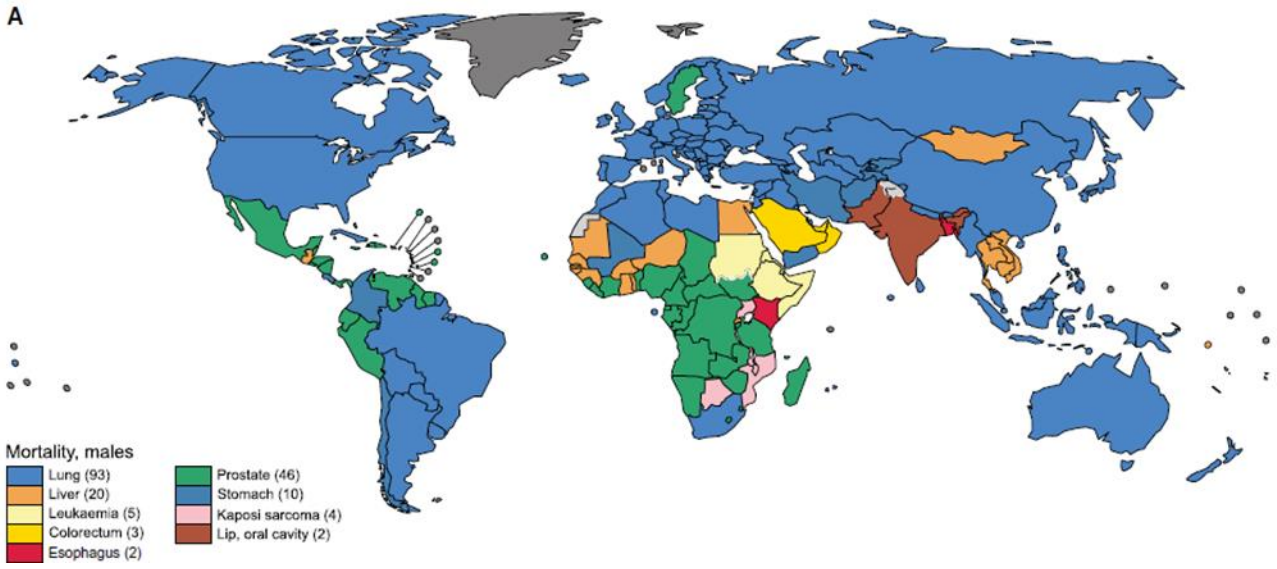


Figura 3-4. Mortalità globale dei più comuni tipi di carcinoma in ogni Paese tra maschi (A) e femmine (B), GLOBOCAN 2018

A conferma di questi dati, la distribuzione dell'OSCC sulla base dello Human Development Index (HDI), indice di misura del benessere di un paese, conferma la sua maggiore distribuzione nei Paesi in via di sviluppo: l'India appare come una regione ad alto rischio, rappresentando circa il 36% tra le popolazioni a più basso indice HDI [3]. L'OSCC presenta un'incidenza quasi due volte maggiore e una mortalità spiccatamente più alta nei paesi a medio-basso indice HDI, nonché predilezione per il sesso maschile [3,7].

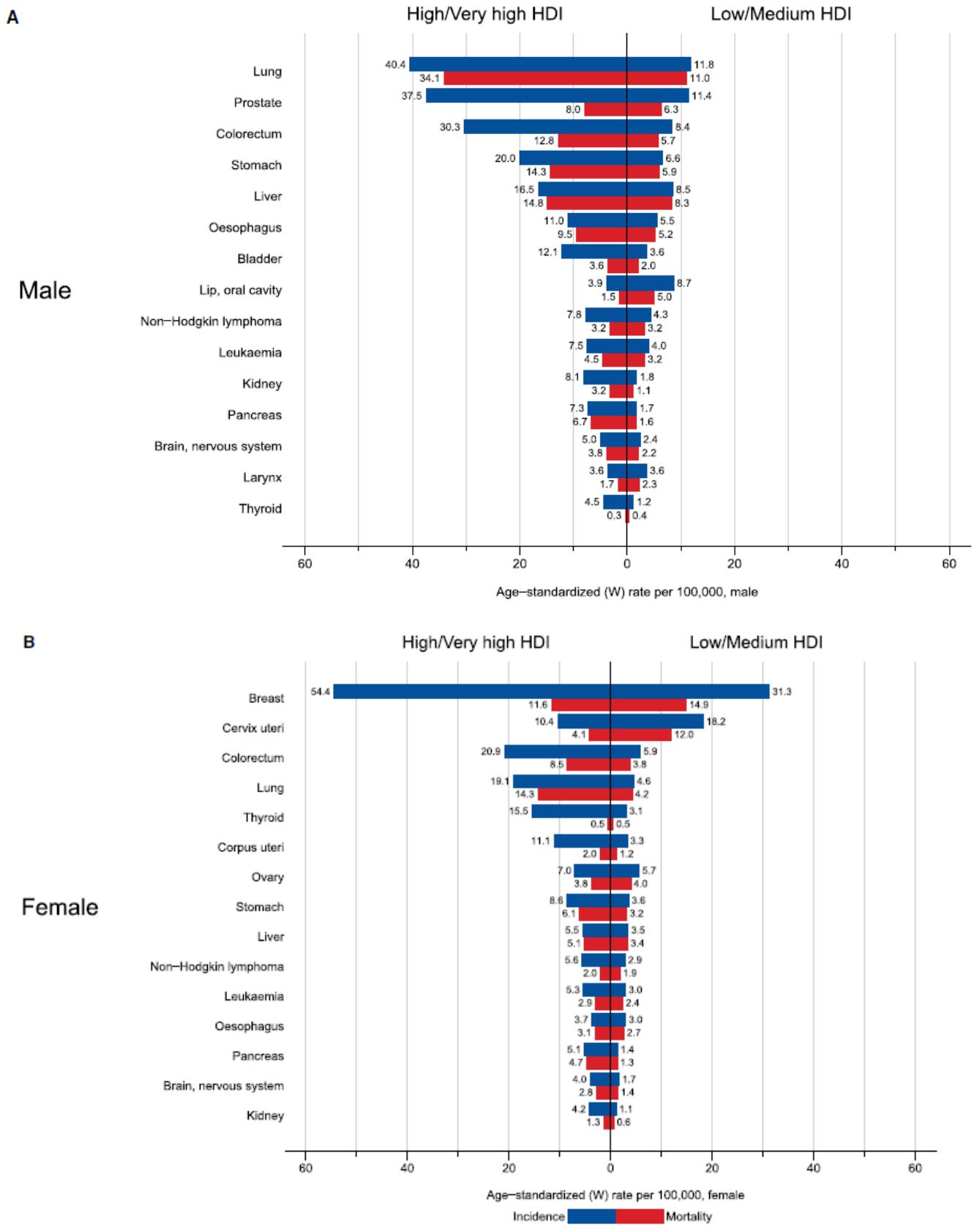


Figura 5-6. Diagramma a barre sull'Incidenza e Mortalità delle forme più comuni di cancro, in paesi ad alto-molto alto HDI versus medio-basso HDI tra maschi (A) e femmine (B), GLOBOCAN 2018.

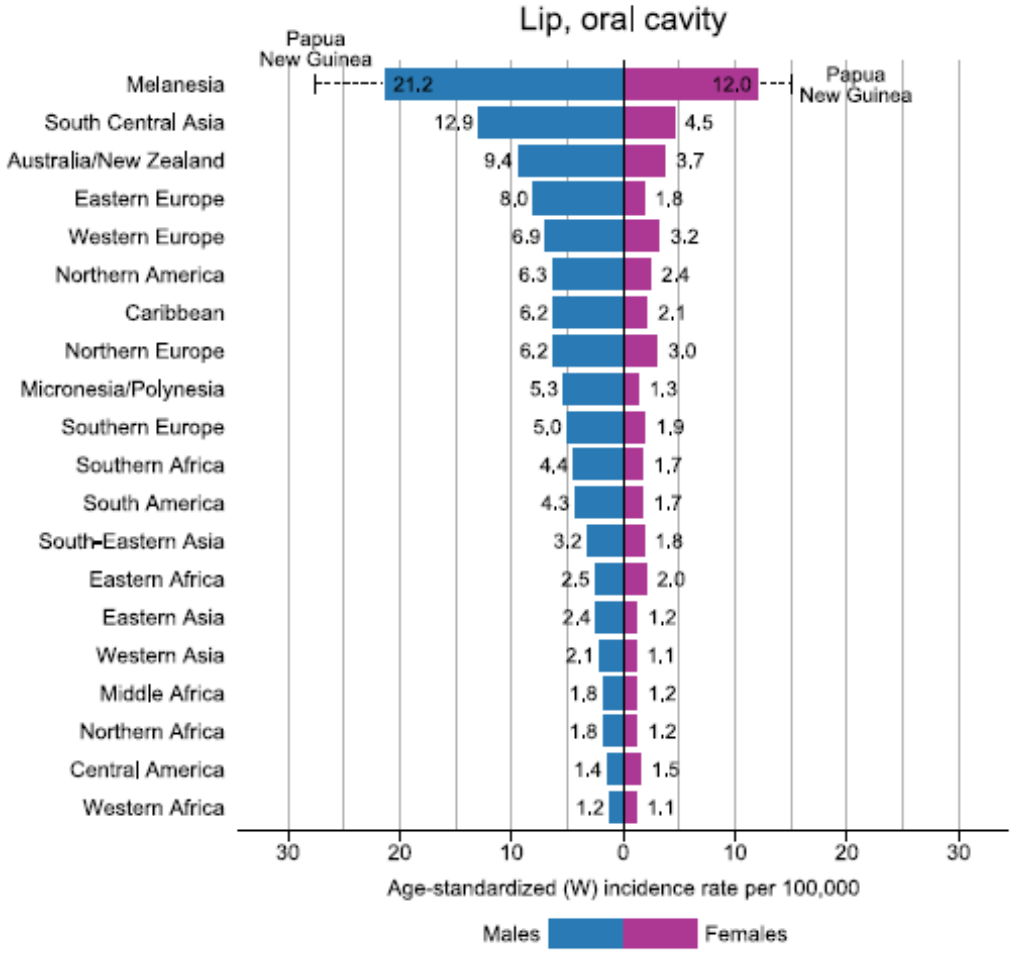


Figura 7. Diagramma a barre sull'Incidenza Regione-specifica, in base al sesso, del carcinoma del labbro e del cavo orale, GLOBOCAN 2018.

L'OSCC, pur non appartenendo alla classifica dei 10 carcinomi più frequenti al mondo, rappresentando la lesione maligna più riscontrata in specifiche regioni o nazioni [3].

L'OSCC ha un'età di insorgenza media tra la sesta e la settima decade, dove la sede più colpita risulta la lingua, per ambo i sessi [2].

Le osservazioni cliniche circa il cambiamento di tendenza di OSCC non sono supportate da dati epidemiologici di buona qualità [5]. Nonostante ciò, esiste una tendenza alquanto preoccupante nell'aumento dei casi di OSCC della lingua in soggetti di età < 45 anni, a prescindere da sesso, predisposizione genetica, esposizione ai più importanti fattori di rischio. [5]. L'origine di questo fenomeno ha bisogno di ulteriori studi per definirne al meglio i fattori di rischio: i soggetti giovani

non manifestano gli esiti dell'esposizione a fattori di rischio quali alcool e tabacco, poiché essi hanno bisogno di un periodo più lungo di esposizione per sviluppare OSCC [2].

1.1.2 FATTORI DI RISCHIO

La cavità orale rappresenta una sede facilmente accessibile durante ogni valutazione clinica, ma la maggior parte dei carcinomi squamocellulari viene diagnosticata in stadio molto avanzato. Il motivo è spesso dovuto alla mancanza di sensibilità da parte del paziente e del clinico, che non riesce spesso a fare una diagnosi corretta e tempestiva [1]. Una diagnosi tardiva riduce drasticamente il tasso di sopravvivenza dell'individuo [1].

"Almeno il 75% dei tumori della testa e del collo è causato dal tabacco e dall'alcool. Le persone che usano sia il tabacco sia l'alcool sono a maggior rischio di sviluppare questi tumori rispetto alle persone che usano uno solo dei due fattori" - *I numeri del Cancro in Italia 2019* -AIOM.

Tabacco

Il potere cancerogeno del tabacco dipende dalla sua modalità d'assunzione (fumato, masticato, sniffato), dal tempo per cui esso viene assunto e dalla quantità.

Il fumo del tabacco contiene sostanze carcinogene, quali *benzopirene* e nitrosamine specifiche del tabacco, ossia *chetone nicotina-derivato della nitrosammina (NNK)* e *N-nitrosonornicotina (NNN)* [8]. NNK, NNN e i loro metaboliti hanno la capacità di provocare modificazioni nei meccanismi di replicazione del DNA [7, 9]. I fumatori hanno un rischio tre volte maggiore di sviluppare OSCC, se comparato ai non fumatori [1]. Il fumo passivo nei non fumatori aumenta dell'87% la possibilità di sviluppare OSCC, rispetto ai non fumatori non esposti a fumo passivo [1].

L'abitudine di fumare il sigaro o la pipa comporta rischio maggiore nell'insorgenza dell'OSCC rispetto al fumo di una normale sigaretta, fatta eccezione per il *reverse smoking*, l'abitudine di alcune popolazioni indiane e Sud-Americane di fumare con la parte accesa della sigaretta nel cavo orale, provocando stretto contatto fra combustione del tabacco e il cavo orale [10].

L'uso di tabacco non fumato, responsabile sia di lesioni precancerose che carcinoma, è un'abitudine abbastanza comune: esso può essere infatti masticato o sniffato. Masticando il tabacco è possibile assorbire nicotina attraverso le mucose del cavo orale, mentre il tabacco da fiuto, è responsabile di una variante di Carcinoma Verrucoso, nota come "*Snuff-dipper's Cancer*" [8]. Il consumo di tabacco senza combustione, masticato o sniffato, si correla ad un rischio sicuramente molto basso di sviluppare OSCC, ma predispone a patologie a carico del parodonto, patologie cardiovascolari, dipendenza psicologica: il suo utilizzo va dunque sempre scoraggiato [10]. Il potenziale cancerogeno del tabacco masticato può essere esacerbato dalla sua combinazione con alcune sostanze: nella cultura indiana è abitudine masticare un mix di tabacco, noce di Betel/Areca (quarta sostanza psicoattiva di comune uso al mondo dopo caffeina, alcool e nicotina), lime e spezie varie, noto come *pan* o *quid*. La masticazione continua di quid e il suo continuo contatto con le mucose provoca irritazione, desquamazione, pigmentazione, traumatismo cronico, che aumenterebbe il rischio di sviluppo della *Fibrosi Orale Submucosa*, disordine potenzialmente maligno con un'incidenza del 4,2% di evolvere in OSCC [11,12].

Alcool

Il consumo di alcolici non è di per sé un fattore di rischio per il carcinoma del cavo orale ed è difficile inquadrare questa sostanza come singolo fattore di rischio per l'OSCC, poiché spesso i pazienti affetti da questa lesione maligna sono forti bevitori e fumatori [8,10].

"Il consumo in dosi massicce di alcool aumenta di 2-3 volte il rischio di carcinoma del cavo orale e l'uso di alcool è coinvolto nel 15% dei carcinomi del cavo orale" - *Oral cavity squamous cell Carcinoma- an Overview,* Oral health and dental management, settembre 2014 [7].

L'etanolo ha un potenziale effetto negativo nel nostro organismo agendo a livello locale, permettendo una maggiore permeabilità delle mucose del cavo orale, dissolve particelle lipidiche e comporta un'atrofia epiteliale in generale. A livello sistemico ha effetto mutageno, comportando un flusso salivare minore, diminuzione della capacità del fegato di affrontare con agenti chimici carcinogeni e,

in alcuni casi, ad indebolimento delle difese immunitarie [1]. Studi molecolari suggeriscono che il rischio di carcinogenesi sia correlato ad un metabolita dell'alcool, l'*acetaldeide*, che altera l'espressione del gene dei cheratinociti. L'alcool agisce in sinergia con il tabacco, aumentando lo sviluppo del carcinoma orale [8].

Agenti infettivi

L'insorgenza di parte dei carcinomi squamocellulari derivano dall'accumulo di alterazioni genetiche provocate da alcuni fattori esogeni, tra cui alcuni miceti e virus.

Candida

Il genere Candida comprende circa 200 specie di miceti lievitiformi Gram+. Alcune specie sono comuni commensali presenti nel cavo orale, in una percentuale variabile dal 10-60% [13]. La candidosi orale è un'infezione da parte di alcune specie di Candida, prima fra tutte *C. albicans*, esacerbate e favorite da fattori predisponenti sistemici (disordini immunologici, endocrini, malnutrizione, terapie antibiotiche, neoplasie maligne) e locali (protesi incongrue, fumo, iposcialia, diete ricche di carboidrati) [13].

La candidosi può partecipare attivamente al processo carcinogenetico oppure può manifestarsi come infezione secondaria nei pazienti con problematiche oncologiche in fase di trattamento (chirurgico e/o radio-chemioterapico) [13].

Controversa è la relazione tra l'infezione da Candida e il rischio di trasformazione maligna di Disordini Potenzialmente Maligni. Una delle forme clinico-istologiche più studiate in tal senso è la Candidosi Cronica Iperplastica, una lesione cronica, spesso asintomatica e di aspetto variegato (a placche, simil-placca, nodulare…). Ad oggi, è difficile determinare se la Candida rappresenti il responsabile diretto di questa lesione, quanto piuttosto un semplice colonizzatore secondario di una lesione leucoplasica già esistente [14].

Le modalità di trasformazione epiteliale in senso maligno indotta dalle varie specie di Candida sono varie, la più indagata è la capacità di produrre sostanze potenzialmente cancerogene, come l'*N-benziletilamina* a partire dai nitriti presenti nel cavo orale (e in particolare nella saliva), favorito anche sa una scarsa igiene orale (oltre ad abbassare drasticamente il pH del cavo orale aumenta i processi di nitrosazione da parte del micete). In sostanza, la candidosi orale deve essere considerata non solo come fattore eziopatogenetico del OSCC, ma anche un possibile agente sovra infettivo che potrebbe portare ad una trasformazione maligna [13].

È possibile riscontrare alcuni ceppi multi resistenti di Candida (*C. glabrata*, *C. dubliniensis*) nei pazienti affetti da OSCC in corso di trattamento tramite radio/chemioterapia: Il meccanismo di queste terapie prevede l'aggressione di cellule a rapido turn-over (come lo strato basale epiteliale e il parenchima ghiandolare) e la riduzione del flusso salivare e questi, uniti alla riduzione delle difese immunitarie conseguente e il cambiamento della microflora del cavo orale, aumentano il rischio di manifestare una candidosi oro-faringea di tipo iatrogeno. È buona norma condurre una profilassi antimicotica per i pazienti oncologici che vanno incontro a radio/chemioterapia al fine di circoscrivere e limitare queste infezioni [13].

Papillomavirus Umano (HPV)

L'HPV appartiene ad una numerosa ed eterogenea famiglia di patogeni, ne esistono circa 150 tipi, classificati in base al loro tropismo per le mucose o per la cute. Nella categoria di HPV con tropismo per le mucose rientrano una serie di sottotipi coinvolti nel carcinoma del testa-collo, carcinoma oro-faringeo, carcinoma del cavo orale [14].

I Papillomavirus delle mucose possono essere suddivisi in *basso rischio* e *alto rischio*, in base al loro potenziale oncogenetico. Tra i Papilloma Virus ad alto rischio troviamo HPV 16 e 18, in cui il tipo 16 è riscontrabile in vari tipi di carcinoma [14]. Secondo dati recenti, circa 15-20% di casi di OSCC di pazienti occidentali e in specifiche regioni orientali, è correlato ad un'infezione da HPV con genotipo ad alto rischio [15].

Nel 2012, *International Agency of Research of Cancer* ha dichiarato che ci fossero sufficienti prove per associare HPV 16 con il carcinoma del cavo orale, in più i carcinomi orali correlati al HPV differiscono dalle forme di tumore HPV negative, in particolare nella risposta clinica e nel tasso complessivo di sopravvivenza [14]. Nella cavità orale sono stati riconosciuti 24 tipi di HPV associati a lesioni benigne e 12 tipi associati a lesioni maligne. Quasi il 99% dei carcinomi del testa-collo associati ad infezione da HPV sono connessi ai sottotipi ad alto rischio 16,18,31,33, di cui HPV 16 rappresenta il sottotipo più comune e HPV 33 stimato come coinvolto nel 10% dei casi [14].

A livello epidemiologico i carcinomi del testa-collo associati ad infezione di HPV si manifestano nei pazienti più giovani, a differenza delle fasce d'età tipiche del carcinoma del testa-collo [2,5]. A livello clinico i tumori associati ad HPV si manifestano con lesioni esofitiche simili alla superficie di una fragola, che coinvolgono la base della lingua e l'area delle tonsille.

Nonostante siano sia stata descritta la correlazione tra disordini potenzialmente maligni (es. leucoplachia, *lichen planus*...) e trasformazione tra una mucosa normale in carcinoma orale, non è stato confermato il ruolo del HPV nelle trasformazioni maligne di lesioni precancerose [14].

Virus dell'epatite C (HCV)

Già dai primi anni 90' sono stati segnalate le prime manifestazioni extraepatiche del Virus dell'Epatite C. Alcune delle manifestazioni extraepatiche più comuni coinvolgono la regione del cavo orale, prevalentemente ed esclusivamente [16]. Sono stati rilevati casi di carcinoma orale a cellule squamose o verrucoso in pazienti HCV positivi associate o meno ad un disordine potenzialmente maligno, in particolar modo il Lichen Planus. Nonostante alcune ricerche suggeriscano che HCV possa rappresentare un agente eziologico del OSCC, sono necessari ulteriori studi prospettivi di coorte per chiarificare tale associazione [16].

Epstein-Barr virus (EBV)

L'infezione da EBV non comporta conseguenze a livello patogenetico a parte quella di stabilire un'infezione persistente e per tutta la vita nella cavità orale. Per il suo caratteristico tropismo per le cellule epiteliali e i linfociti B, è possibile riscontrare un'infezione da EBV in tonsille, adenoidi, base della lingua, regioni ricche di tessuto linfoide e dove si manifestano la maggior parte dei Carcinomi Orofaringei Squamo- cellulari. Studi *in vitro* hanno dimostrato il suo potenziale oncogeno, ovvero la capacità da parte di linfociti B infetti da HBV di proliferare in maniera indefinita. Solitamente, l'infezione persistente da parte di EBV viene controllata dalle nostre difese immunitarie, ma nei pazienti immunosoppressi vi è un aumento del rischio di sviluppo di una lesione maligna [17].

Altri Fattori di Rischio

La caratteristica multifattoriale della carcinogenesi è dimostrata dalla presenza di individui che manifestano lesioni maligne nel cavo orale sebbene non esposti ai principali fattori di rischio (fumo, tabacco).

Radiazioni UV

La Cheilosi Attinica (più conosciuta come Cheilite attinica) fa parte della categoria di Disordini Potenzialmente Maligni oro-facciali ad alto rischio di trasformazione maligna. Questa lesione è detta *disordine occupazionale*, poiché è spesso legata alla professione svolta dal paziente. Marinai, contadini, ed altre categorie lavorative, svolgono infatti la loro giornata lavorativa sotto costante esposizione ai raggi UV-A e UV-B (questi ultimi sono i maggiori responsabili). Questa lesione ha incidenza maggiore sul bordo del vermiglio del labbro superiore, inferiore e rappresenta l'equivalente labiale della Cheratosi Solare della pelle. Ne esiste una forma *acuta*, dovuta ad esposizione occasionale e intensa al Sole, caratterizzata da una sua naturale regressione quando il paziente viene allontanato dall'agente scatenante, e una forma *cronica*, dovuta ad esposizione prolungata e continua al Sole [18].

Scarsa igiene orale

Una scarsa igiene orale potrebbe rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza del OSCC, ma è difficile valutare il ruolo indipendente svolto da igiene orale precaria nella cancerogenesi orale. È possibile però supporre che l'irritazione cronica della mucosa orale provocata dalla cattiva igiene, possa fungere da modificatore dei meccanismi di cancerogenesi, favorendo l'azione oncogena di altri carcinogeni [13].

Predisposizione genetica

Molte persone vengono esposte nel corso della loro vita a fumo e tabacco, ma solo alcune di loro sviluppano un carcinoma del testa-collo. Numerosi studi suggeriscono che la presunta predisposizione genetica a sviluppare OSCC potrebbe essere dovuta ad una suscettibilità maggiore, geneticamente determinata, all'azione mutagena di cancerogeni contenuti nel fumo di tabacco e bevande alcoliche. Ciò che emerge dagli studi condotti da Copper et al. è che la predisposizione genetica si "attiva" in pazienti che si espongono a fumo e alcool. È possibile ereditare una predisposizione che non sia direttamente coinvolta nella via diretta di carcinogenesi, ma che aumenta la probabilità di una mutazione o un effetto di aumento della via di carcinogenesi.

Il metabolismo di componenti pro-cancerogeni del fumo di sigaretta è determinato da specifici enzimi, quali l'enzima P450 e XME: polimorfismi genetici a carico di questi enzimi hanno un ruolo chiave nella predisposizione genetica di tutti i tumori del testa-collo indotti da tabacco. [19]

Trauma meccanico cronico

L'irritazione meccanica cronica (CMI) della mucosa orale rappresenta il risultato di ripetuti danni a carico delle mucose provocati dall'azione singola o sinergica di alcuni agenti lesivi, tra cui: denti difettosi (dovuti ad usura, processi cariosi o traumi), protesi mobili non congrue (presenza di superfici ruvide o appuntite, mancanza di ritenzione, stabilità o flange troppo estese), para-funzioni e abitudini viziate (bruxismo, abitudine di morsicare la guancia/lingua).

Il risultato di questo ripetuto traumatismo potrebbe generare cambiamenti nella mucosa sana o intensificare precedenti disturbi del cavo orale. Gli effetti di questo traumatismo dipendono inoltre da durata e intensità. Il CMI potrebbe essere considerato un potenziale fattore di rischio per il Carcinoma del cavo orale, e persino un disordine potenzialmente maligno, ma le scarse evidenze scientifiche e il numero esiguo di casi presentati in numerosi studi epidemiologici non permettono di confermare con certezza questa tesi. [20].

Dieta e Nutrizione

Il consumo di alimenti ricchi di vitamina C, E, Carotenoidi, riduce il rischio di insorgenza del OSCC, mentre diete ipercaloriche e ricche di grassi ne aumentano il rischio. Stati carenziali di ferro, soprattutto se in forme severe e croniche che possono indurre la comparsa della sindrome di Plummer-Vinson (anemia sideropenica, disfagia, membrane fibrose esofagee, glossite trofica, ecc..), nonché deficit di vitamina A sembrerebbero essere correlati ad insorgenza di OSCC. [13]

Immunosoppressione

Soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo e rene sono iatrogenicamente immunosoppressi e la chemioterapia e radioterapia somministrata durante la fase di condizionamento può rappresentare un fattore di rischio di sviluppo di neoplasie. Per lungo tempo si è ritenuto che l'immunosoppressione nei pazienti affetti da AIDS potesse rappresentare altresì un fattore di rischio, ma non esistono evidenze scientifiche a conferma di tale tesi [10, 13].

1.1.3 CARATTERISTICHE CLINICHE

Molti carcinomi del cavo orale sono preceduti da disordini potenzialmente maligni (PMD), lesioni della mucosa orale ad aumentato rischio di trasformazione maligna, la cui eziologia è associata a fattori esogeni ed endogeni. [21] L'analisi degli aspetti clinici di queste lesioni è, per il momento, il miglior strumento di prevenzione, in quanto non esiste ancora alcun segno patognomonico istopatologico o molecolare della loro trasformazione maligna [21].

Il rischio di metastasi cervicale rappresenta il principale indice prognostico del carcinoma del cavo orale. A differenza di altri tipi di cancro, il carcinoma del cavo orale tende a metastatizzare nelle prime fasi a livello dei linfonodi regionali [21]. Il corretto iter per la diagnosi dell'OSCC comprende: *Anamnesi, esame clinico, esami strumentali.*

Anamnesi

La presenza di una singola lesione nel cavo orale per più di 3 settimane è fonte di sospetto poiché potrebbe rappresentare una lesione maligna [7, 22]. Pertanto, occorre sottoporre il paziente ad un'attenta raccolta anamnestica, in cui è importante rilevare la presenza dei fattori di rischio primari e secondari. I campanelli d'allarme che fanno sospettare la natura oncologica di una lesione sono [7,13,22]:

- Una macchia pigmentata o una chiazza bianca squamosa persistente che aumenta improvvisamente di dimensioni;
- Un'ulcera che tende a non guarire una volta rimosso il sospetto agente eziologico;
- Un sanguinamento gengivale spontaneo più o meno diffuso;
- La presenza di mobilità dentale accentuata in assenza di malattia parodontale;
- Una ferita che tende a non guarire;
- La perdita di ritenzione di una protesi;
- Alterazioni della sensibilità (ipoestesie, parestesie);
- Sintomatologia dolorosa in fase di apertura/chiusura della bocca;

- Una progressiva asimmetria facciale;
- Disfagia orofaringea e difficoltà di linguaggio;
- Perdita recente di elementi.

Il dolore è un sintomo molto comune, ma che si manifesta quando la lesione ha raggiunto un grado di infiltrazione importante e rappresenta anche il momento in cui il paziente giunge alle attenzioni del clinico [22]. L'OSCC è caratterizzato da dolore intenso, non spontaneo, legato alla funzione, ma non predicibile [23]. Le dimensioni del tumore non sono generalmente correlate in modo stretto alla severità del dolore, ma la trasformazione di un PMD in carcinoma è spesso associata a sintomatologia algica [23]. In alcune sedi, come lingua e pavimento del cavo orale, il dolore insorge nelle prime fasi, mentre nel carcinoma del labbro e della mucosa orale manifestano dolore intenso nelle fasi più avanzate [22].

Esame clinico

	Strumenti	Funzione
FASE 1 Ispezione visiva	• Specchietto; • Luce; • Fibroscopio.	Valutazione preliminare della lesione e dell'eventuale coinvolgimento oro/rino-faringeo.
FASE 2 Palpazione	• Guanti; • Garza sterile.	Palpazione della lesione: valutazione della consistenza, bordi e infiltrazione. Palpazione dei linfonodi cervicali: la presenza di masse sul collo potrebbero rappresentare metastasi.

Tabella 1. Schematizzazione dell'esame clinico in poltrona.

L’aspetto clinico dell’OSCC conclamato e negli stadi più avanzati può essere distinto in tre forme: esofitica, endofitica, ulcerata.

- Forma **esofitica** (Figura 5): Escrescenza rilevata, pluri-mammellonata, a cavolfiore, di colore bianco o bianco-rosa, confini poco definiti, dure alla palpazione [13,22]. Corrispondono a forme istologiche ben differenziate. Di raro riscontro è la forma Proliferativa Superficiale, che va in diagnosi differenziale con la Leucoplachia Verrucosa Proliferativa (Figura 9-10). [13]



Figura 8. Carcinoma orale, pavimento del cavo orale, variante esofitica.



*Figura 9-10***.** Carcinoma del cavo orale, variante Proliferativa Superficiale (sinistra) versus Leucoplachia Verrucosa Proliferativa (destra).

- Forma **endofitica:** La forma endofitica comprende una variante *nodulare*, caratterizzata da un nodulo indurito sotto un'apparente mucosa integra (Figura 11) e una *infiltrante*, un indurimento della parte interessata associato a importante deficit funzionale (Figura 12).



Figura 11. Carcinoma del cavo orale, variante endofitica nodulare.



Figura 12. Carcinoma del cavo orale, variante endofitica infiltrante

- Forma **ulcerata:** È la manifestazione più comune e nota di OSCC [13,22]. Questa variante presenta una superficie e margini irregolari, dura ed elevata alla palpazione [22]. Il fondo è sanguinante, vegetante, talvolta coperto da materiale necrotico [13]. Esistono combinazioni tra l'aspetto vegetante e ulcerato, dette *ulcero-vegetanti* [13]. Lesioni molto estese sono associate a dolore intenso, che arriva fino all'orecchio ipsilaterale [22].



Figura 13. Carcinoma del cavo orale, bordo laterale della lingua, variante ulcerata.

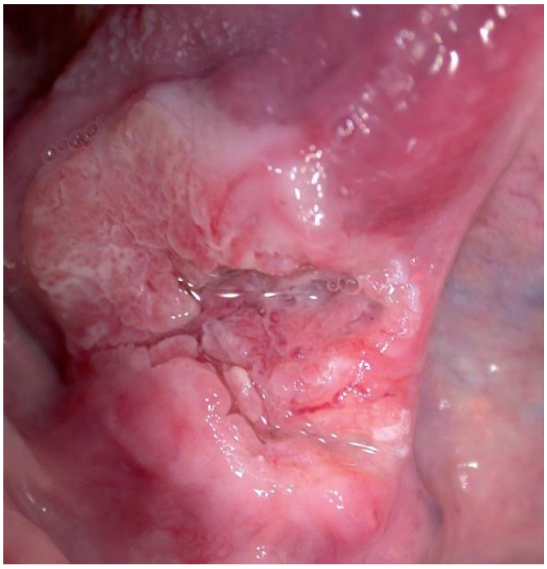


Figura 14. Carcinoma del cavo orale, variante mista ulcero-vegetante

Esami strumentali

Diagnosi di diffusione linfatica

La palpazione linfonodale (Tabella 1) non è una manovra sufficiente in fase di diagnosi ed è inoltre operatore dipendente. Grazie all'esame strumentale (Ecografia, TC, RM) viene approfondito quanto sospettato dal clinico. L'invasività del tumore e il successo della terapia dipendono da: posizione, dimensioni del tumore primario, *staging* T, *grading*, profondità di invasione (importantissima variabile per la prognosi), marker biologici del tumore, invasione perineurale, compliance del paziente [24].

La diffusione linfatica è un evento frequente, talora precoce, e costituisce l'elemento prognostico negativo più importante: lo schema di diffusione è dettato principalmente dalla dimensione, ma soprattutto dalla sede, interessando dapprima i linfonodi *sottomandibolari* e *sottomentonieri*. I tumori primitivi localizzati sulla linea mediana metastatizzano bilateralmente, mentre nelle sedi laterali la diffusione è monolaterale [13]. Occasionalmente (5% dei casi) è possibile riscontrare un ingrossamento linfonodale in assenza di tumore primario: in questi casi è probabile che il carcinoma si trovi in sedi che sfuggono anche ad un occhio esperto (base della lingua, tonsille, nasofaringe) [22].

Diagnosi di metastasi a distanza

Gli esami strumentali accertano la presenza di metastasi a distanza, evento raro nel OSCC [13]. Il polmone è il sito più comune di metastasi a distanza dei carcinomi squamocellulari: la presenza di metastasi a distanza peggiora la prognosi e riduce la probabilità di successo della terapia [25]. Nel 28% dei casi si riscontrano metastasi a distanza senza evidenza di tumore locoregionale [13].

1.1.4 SEDI ANATOMICHE

Carcinoma della lingua

La lingua, assieme al pavimento del cavo orale, rappresentano la sede maggiormente coinvolta (circa il 50% dei casi di OSCC) [1,5,13,22]. Il *bordo laterale* della lingua e la *superficie ventrale* sono di solito precedute da traumatismi cronici. La forma più osservata in queste regioni è quella ulcerata, seguita dalla forma esofitica, che producono generalmente dolore irradiato all'orecchio ipsilaterale. Nella porzione *ventrale* sono predominanti le forme ulcero-vegetanti o forme miste. Sul *dorso* (raro) è riscontrabile nella forma ulcerata che tende ad espandersi piuttosto che approfondirsi, generalmente associata a disordini potenzialmente maligni come lichen planus o leucoplachia [26].

Clinicamente si manifesta come un'area leucoplasica o eritroplasica, un'ulcera, una massa esofitica papillomatosa o un nodulo intramurale sottomucoso [13]. La sintomatologia è generalmente assente nelle prime fasi, per poi manifestarsi in fase avanzata con disfagia, disfonia e sanguinamento.

Questi tumori evolvono attraverso la porzione ventrale al pavimento del cavo orale [26], dove appaiono come un'ostruzione salivare, "congelamento" della zona sopraioidea con edema marcato, duro e cute a buccia d'arancia [13]. L'infiltrazione nervosa del *nervo linguale* provoca un dolore diffuso o penetrante che può arrivare fino all'orecchio. Il coinvolgimento del *nervo ipoglosso* si manifesta invece con deficit motorio, punta deviata [13].

La crescita avviene attraverso la profondità dell'organo. La muscolatura attua un effetto spremitura delle cellule neoplastiche che provoca focolai multipli rispetto alla massa principale. Nell'infiltrazione in profondità le fasce e il rafe mediano oppongono resistenza all'infiltrazione diretta, mentre la contrazione del tessuto muscolare favorisce l'invasione precoce e la progressione cellulare [13]. Il coinvolgimento linfonodale sottomandibolare è un sintomo di esordio di una neoplasia linguale [13], la probabilità che siano coinvolti aumenta all'aumentare delle dimensioni della lesione [26]. Il carcinoma della lingua è caratterizzato da una notevole incidenza di linfoadenopatie metastatiche. Non è raro il riscontro di metastasi bilaterali correlate al ricco plesso sottomucoso che comunica liberamente attraverso la linea mediana [13].

Carcinoma del pavimento orale

L'OSCC del pavimento del cavo orale comincia principalmente nella porzione anteriore come delle aree rosse e/o bianche come lesioni nodulari, ulcerate, dure alla palpazione [26]. Questa lesione avanza dalla porzione superficiale ai tessuti più profondi, invadendo i muscoli della bocca, i linfonodi submentonieri, submaxillari, cervicali [26]. A volte, l'invasione del dotto di Warthon può ostacolare il flusso salivare e manifestarsi come una tumefazione simile ad una metastasi linfonodale [13]. L'ulcerazione può estendersi, coinvolgendo il *nervo linguale* con dolore urente, mentre l'infiltrazione profonda impedisce la motilità linguale [13]. La tumefazione del labbro inferiore indica il superamento della mandibola e l'invasione del fornice [13]. Nei primi stadi non vi è alcun sintomo doloroso ma potrebbe essere alterata la mobilità della lingua [26]. La crescita può avvenire in direzione posteriore (interessando il corpo della lingua), in profondità (infiltrando il dotto di Warthon), anteriore (verso la mandibola): il comportamento invasivo di questo tumore si accentua in una mandibola edentula [13]. La diffusione linfatica è precoce, coinvolgendo in ordine i sottomandibolari, poi i sottomentonieri. In un caso su quattro le metastasi linfonodali sono bilaterali. [13]. Il la porzione laterale del pavimento rappresenta la sede di circa il 18% dei carcinomi orali. Questo tipo di neoplasie tendono ad estendersi sul piano verticale piuttosto che orizzontale e si presentano solitamente come un'erosione, un'ulcera, una lesione infiltrata *a scodella*. La sintomatologia è generalmente tardiva, correlata all'estensione della neoplasia.

La diffusione della neoplasia in profondità determina un dolore più intenso e duraturo, sensazione di corpo estraneo e impossibilità di movimento della lingua. Nei casi di infiltrazione del *nervo mandibolare* si ha anestesia/ipoestesia del labbro e del mento. L'infiltrazione profonda in direzione mediale è la più frequente, con interessamento della muscolatura linguale estrinseca e diffusione lungo la muscolatura [13].

Carcinoma del labbro

Il carcinoma del labbro rappresenta circa il 20% delle neoplasie orali, con marcata predilezione per il sesso maschile (l'uso di rossetti contenenti SPF da parte dei soggetti di sesso femminile sembrerebbe avere un effetto protettivo per tale lesione [27]). La sede più colpita è la porzione paramediana del labbro inferiore, che è anche la sede in cui è più comune riscontrare DMP come la cheilite attinica [26]. Clinicamente è osservabile come un'area con perdita superficiale di tessuto, erosa, ulcerata e occasionalmente lesioni di forma esofitica. L'esposizione ai raggi solari produce nei pazienti affetti la tipica alterazione di forma estroflessa del labbro, detta *lip on balcony* [26].

A volte appare come un'area di atrofia del vermiglio, con scaglie che non tendono a cadere ma ad accumularsi, formando un'area cheratosica [26]. Queste aree possono alternarsi a lesione leucoplasiche, eritro-leucoplasiche, che tendono a rompersi, erodere e ulcerarsi [26]. L'ulcerazione precoce, evento raro, indica una tendenza all'infiltrazione [13].

Il carcinoma del labbro sviluppa lentamente e negli stadi più avanzati può estendersi alla commessura labiale e alla gengiva. Le forme avanzate nel labbro inferiore o nella commessura possono diffondere attraverso l'invasione perineurale del *nervo metoniero* [13]. Lo sviluppo metastasi linfonodali nelle aree submentali e submandibolari [26] è correlato allo spessore tumorale, il pattern di crescita all'invasione perineurale [13].

Carcinoma del trigono retromolare

Il trigono retromolare rappresenta la sede di carcinoma del cavo orale, ma anche di neoplasie maligne delle ghiandole salivari. Nelle prime fasi la sintomatologia è scarsa, clinicamente è osservabile come una superficie erosa o ulcerata, spesso estesa ad un sito post-estrattivo. Negli stadi avanzati i sintomi si caratterizzano in base alla sede di diffusione (odinofagia, otalgia, dolore linguale, trisma ingravescente) e l'anestesia del labbro è sintomo di infiltrazione del *n. mandibolare*. La diffusione di questa neoplasia interessa il piano mediale, inferiore, superiore [13].

Carcinoma della mucosa buccale

L'insorgenza di carcinomi in quest'area è poco frequente [13]. Spesso derivano dallo sviluppo di lesioni precedenti. Nella parte anteriore della mucosa sono molto comuni forme leucoplasiche o eritroplasiche, mentre nella porzione posteriore è spesso secondaria a lesioni traumatiche o lichen planus. Uno dei primi segni di trasformazione è l'indurimento di una lesione eritroplasica che ha tendenza a svilupparsi con crescita esofitica, raramente ulcerata. Quando la lesione coinvolge il terzo posteriore si presenta come una lesione endofitica o ulcerata, con prognosi peggiore rispetto al terzo anteriore [26]. Il sintomo d'esordio è costituito da una linfadenopatia sottomandibolare, talvolta accompagnata da dolore urente o sensazione di corpo estraneo, mentre nelle forme avanzate si riscontrano trisma e dolore [13]. La diffusione locale avviene in tutte le direzioni. La diffusione profonda è spesso impedita dal muscolo buccinatore, che funge da barriera: il superamento di questo ostacolo è osservabile solo in forme avanzate. L'estensione al fornice e alla gengiva può coinvolgere la mandibola. La linfatica comprende i sottomandibolari e i sottomentonieri [13].

Carcinoma del palato duro e della gengiva superiore

È molto difficile individuare lesioni precoci in queste due sedi [26], caratterizzate da un costante sconfinamento da una sede all'altra [13]. Sono lesioni spesso associate a malattia parodontale, processo infiammatorio cronico che rappresenta un importante fattore di rischio [26].

In questa sede è facile incontrare vari tipi di neoplasie oltre il carcinoma squamo cellulare, come melanomi e carcinomi delle ghiandole salivari [13]. Palato duro e gengiva superiore rappresentano l'1-5% delle neoplasie del cavo orale, l'età di maggiore insorgenza è tra la VI e la VII decade, con frequenza maggiore negli individui di sesso maschile (rapporto M/F 5:1) [13]. Negli stadi iniziali il carcinoma della gengiva appare come una a macchia rossa e/o bianca, aspetto leggermente vegetante, estesa sulla superficie, a causa della resistenza offerta dal periostio [26]. Negli stadi più avanzati assume la forma di una massa tumorale, con possibile invasione ossea e conseguente mobilità dentale, dolore, trisma. La progressione attraverso i linfonodi interessa i sottomentonieri, sottomandibolari e

la regione carotidea, le sedi più comuni di metastasi bilaterali. Le lesioni antero-inferiori invece progrediscono attraverso il pavimento del cavo orale e la zona ventrale della lingua. Se il tumore si trova posteriormente invade non solo il pavimento, ma anche i muscoli masticatori [26].

Carcinoma della gengiva inferiore

Tre quarti dei carcinomi gengivali interessano la gengiva inferiore, mentre solo un quarto quella superiore [13]. L'aspetto clinico e la sintomatologia aspecifica di questa lesione rendono difficile la diagnosi: spesso viene confusa con un'*epulide* o malattia parodontale. L'estrazione di elementi vicini e il tentativo di asportare una lesione erroneamente considerata benigna hanno come conseguenza l'estensione ossea di questa neoplasia e la sede di invasione dipende dalla posizione della neoplasia rispetto al piano osseo. Negli stadi più avanzati la lesione è inconfondibile e tende ad infiltrare nelle aree vicine. Le forme più comuni sono quella esofitica e quella ulcerativa.

La gengiva rappresenta un'area mucosa di estensione limitata, dunque il 90% dei carcinomi tende a superare la sede iniziale e a diffondere nelle sedi vicine. Il coinvolgimento linfonodale è tardivo: nella porzione anteriore le metastasi possono essere bilaterali ai linfonodi sottomandibolari e sottomentonieri, mentre posteriormente il coinvolgimento è monolaterale e interessa i linfonodi sottomandibolari e giugulodigastrici [13].

1.1.5 GRADING ISTOLOGICO

La carcinogenesi nasce ed evolve a partire da un iniziale insulto cellulare alla formazione di una neoplasia maligna e, istologicamente, la lesione attraversa varie fasi prima di arrivare alla trasformazione finale in carcinoma [28].

La mucosa orale è costituita da un epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato, organizzato in tre livelli: strato basale, strato a cellule poliedriche e strato superficiale [29]. Il carcinoma del cavo orale origina da una proliferazione alterata di cellule squamose displastiche, che degraderanno successivamente lo strato basale [28]. La degradazione dello strato basale comporta distruzione locale e metastasi (quest'ultima dipende dal grado di differenziazione delle cellule rispetto all'epitelio sano). L'invasione locale nel connettivo sottostante si manifesta attraverso cordoni e isolotti di cellule epiteliali [28]. L'iniziale classificazione di un carcinoma a cellule squamose di basa sul grado di differenziazione, essenziale per valutare la crescita tumorale e la sua capacità di metastatizzare:

1) OSCC a ***cellule ben differenziate***: cellule squamose ben differenziate, organizzate in isole di differenti forme e dimensioni, con all'interno perle cornee. All'interno delle perle le cellule sono acidofile, nucleo picnotico e presenza di cariolisi, mentre le altre cellule hanno nuclei di varia forma e dimensioni, più grandi dei nuclei di cellule epiteliali normali [29].

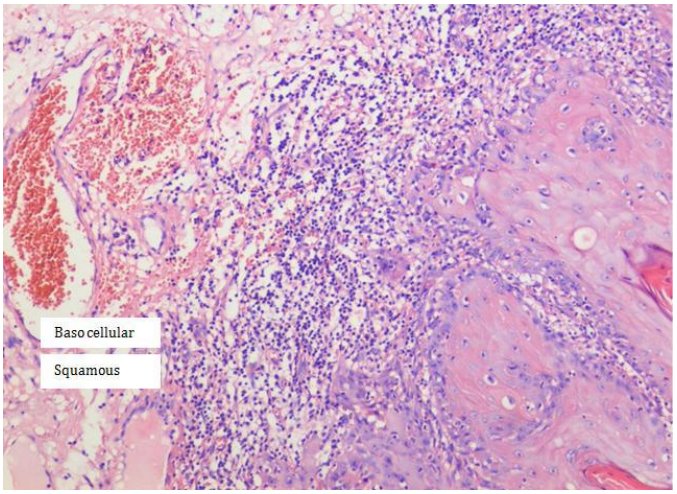


Figura 15. OSCC a cellule ben differenziate

2) ***OSCC a cellule moderatamente differenziate***: cellule neoplastiche epiteliali di aspetto atipico e organizzate in isole, di forma ovale, oblunga, rotonda dove infiltra lo stroma tumorale. In periferia le isole cancerose appaiono separate da elementi fibrosi dello stroma o cellule infiammatorie. I nuclei delle cellule neoplastiche hanno differenti forme e dimensioni, molti appaiono ipocromici con grandi nucleoli. Le cellule tumorali appaiono come atipiche, sparpagliate in maniera diffusa nello stroma della mucosa orale, labiale, linguale, con scarse giunzioni intercellulari. Spesso le cellule tumorali hanno nuclei larghi, deformati, ipercromici o ipocromici, a punta di spillo o a forma di germoglio, con multiple mitosi atipiche. Stroma ricco di cellule infiammatorie e vasi angiogenici [29].

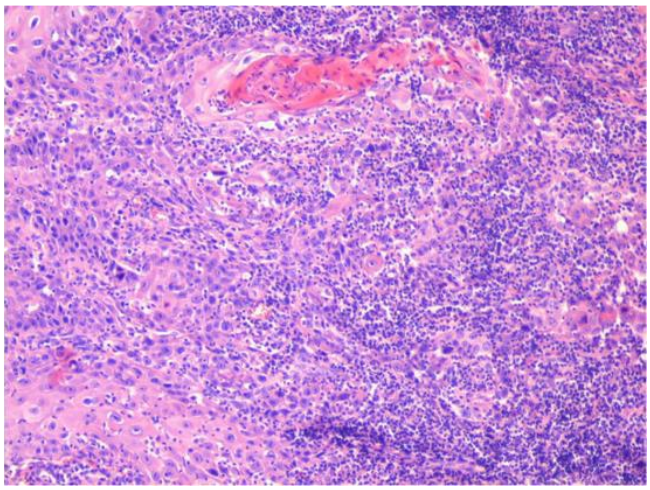


Figura 16. OSCC a cellule moderatamente differenziate

3) OSCC a cellule scarsamente differenziate: cellule organizzate in cordoni, isole oppure cellule epitelioidi organizzate in varie forme e dimensioni, diverse dall'epitelio normale. I vari aspetti delle cellule epiteliali ci porta a pensare che i tumori maligni siano entità eterogenee, multicellulari, contenenti varie linee cellulari, le cui interazioni tra loro stesse e con la matrice extracellulare siano dinamiche e promuovano la proliferazione cellulare, movimento e differenziazione della neoplasia. Lo stroma tumorale è il risultato della conversione del corion epiteliale in stroma con particolari caratteristiche, come una reazione di adattamento all'invasione tumorale. A causa della sua densità vascolare ha ruolo di nutrizione e supporto

delle cellule tumorali. Subito dopo la rottura della membrana basale e l'invasione delle cellule cancerose nel connettivo sottostante, si manifesta una lesione infiammatoria, che porta alla formazione di tessuto di granulazione che matura in stroma tumorale. In questo stroma tumorale, sotto l'induzione di fattori angiogenetici e infiammatori, formerà un ricco *network* di vasi che assicura la proliferazione del tumore [29].

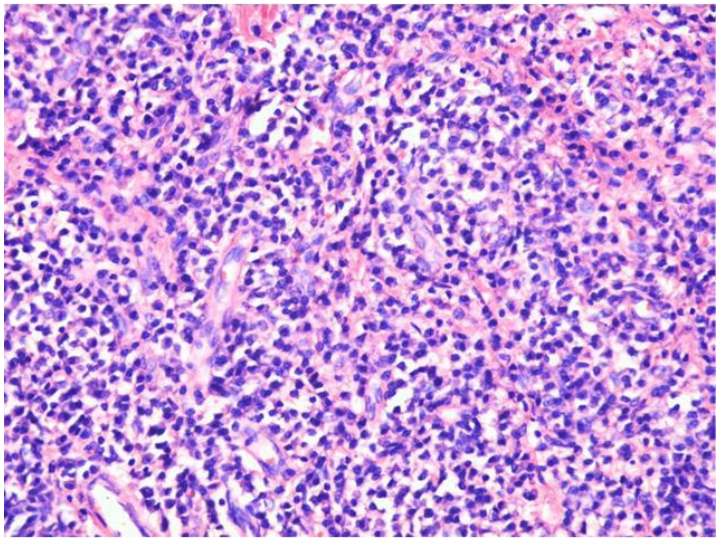


Figura 17. OSCC a cellule scarsamente differenziate.

La classificazione istologica del carcinoma del cavo orale è inoltre completata dallo studio del Fronte di Invasione Tumorale (TIF). Il TIF comprende l'area della lesione con la maggiore profondità di invasione e progressione all'interno dei tessuti circostanti. Il TIF è considerata l'area maggiormente rappresentativa del tumore, si caratterizza da quattro elementi: grado di cheratinizzazione, polimorfismo nucleare, infiltrazione linfocitaria e pattern di invasione [28].

G	G Definition
GX	Cannot be assessed
G1	Well differentiated
G2	Moderately differentiated
G3	Poorly differentiated

Tabella 2. Granding Istologico

1.1.6 STAGING TNM

L'OSCC condivide una stadiazione TNM simile a quella di altre neoplasie del distretto testa-collo [30]. Lo staging TNM, unito al grading istologico e allo status di salute generale del paziente, sono di vitale importanza per la prognosi e per la scelta della terapia più adatta. Lo staging è un sistema dinamico, modificabile in fase di diagnosi e trattamento [30].

È necessario ricordare che pazienti che presentano OSCC associati a HPV rispondo meglio alla radioterapia/chemioterapia. Questo comporta un tasso di curabilità più alto e migliore prognosi [15]. Di conseguenza, questo tipo di lesioni ha una stadiazione TNM specifica.

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	*Labbro*: tumore che invade la corticale ossea o il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale o la cute del viso. *Cavo orale*: 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	*Cavo orale*: tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o la carotide interna.

Tabella 3. Parametro T (descrizione grandezza ed estensione 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, 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 4. Parametro N (valutazione coinvolgimento linfonodi regionali

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

Tabella 5. Parametro M (valutazione presenza/assenza metastasi lontane dal tumore primario)

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

Tabella 6. Stadiazione

1.2 BUDDING TUMORALE

1.2.1 INTRODUZIONE

Lo *staging* TNM rappresenta il goldstandard per la stratificazione prognostica e per la pianificazione del piano di trattamento del paziente affetto da OSCC. Per motivi legati allo *staging* i carcinomi di tutta la cavità orale, inclusi i 2/3 anteriori della lingua, vengono solitamente stadiati allo stesso modo: il loro comportamento biologico è infatti molto simile [31]. Tuttavia, casi di OSCC accumunati dallo stesso *staging* potrebbero avere una sopravvivenza significativamente diversa [32]: è infatti noto che i carcinomi in stadio precoce (T1/T2cN0) nascondano metastasi linfonodali occulte in una percentuale non trascurabile dei casi, mostrando un comportamento aggressivo e una prognosi infausta [33]. Il parametro TNM risulta dunque non sufficientemente accurato nella valutazione di quei carcinomi che vengono gergalmente definiti come "presi per tempo". Nonostante i progressi raggiunti nella ricerca e nelle terapie, il tasso di sopravvivenza a 5 anni di pazienti con OSCC rimane, ad oggi, inferiore al 50% [34]: è dunque necessario sviluppare una strategia che permetta di stratificare il paziente in base alla sua probabilità di manifestare metastasi linfonodali e recidive.

Al contrario, per la prognosi istopatologica, ci si basa principalmente sul *grading* istologico, la valutazione dei margini chirurgici, la profondità di invasione, l'invasione linfovascolare e perineurale. L'attuale ricerca clinica è impegnata nell'individuazione di parametri istopatologici che consentano di categorizzare il paziente in base all'aggressività del tumore, prevedere l'*outcome* più probabile [35] e offrire una valida guida per impostare una terapia personalizzata [33].

1.2.2 DEFINIZIONE

Le cellule tumorali sono caratterizzate da un comportamento molecolare eterogeneo, che dipende dal sito in cui risiedono. Il Fronte di Invasione Tumorale (TIF) rappresenta un sito con caratteristiche tali da fornire informazioni utili nella valutazione della prognosi di numerosi tumori solidi (colon retto, vie aero digestive superiori, cavo orale) [36].

Il Budding Tumorale (*Tumor Budding*, TB) rappresenta una caratteristica istopatologica che si manifesta lungo il TIF ed è un potenziale indice di aggressività e prognosi infausta [36]. Descritto per la prima volta nello studio dei carcinomi del colono-retto, il TB si definisce come "una cellula singola isolata o un piccolo cluster composto da meno di cinque cellule a livello del TIF che rappresentano una sottopopolazione di cellule cancerose indifferenziate dal comportamento aggressivo" [37].

Proposte di standardizzazione: International TB Consensus Conference (ITBCC)

L'International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC), tenutosi a Berna nel 2016, è considerato l'evento cardine nel raggiungimento di un ampio consenso tra gli esperti su un metodo di valutazione del TB internazionale che fosse *evidence-based* (in particolare nel carcinoma del colon-retto). Dai risultati di questo *meeting* hanno preso spunto numerosi studi riguardanti diversi tumori solidi, tra cui il OSCC [32].

Per quanto riguarda il carcinoma del cavo orale, lo studio di T. Xie et al. (2019) ha confermato la semplicità, l'affidabilità, la riproducibilità e il ruolo prognostico del TB, sulla base delle raccomandazioni del ITBCC, nel Carcinoma a Cellule Squamose della Lingua (OTSCC), sito di maggior incidenza del OSCC [38].

La sopravvivenza del paziente affetto da carcinoma: i quattro endpoint della ricerca

Secondo il Dizionario dei Termini del Cancro della NCI è possibile classificare la sopravvivenza de un paziente in categorie, a seconda di dove uno studio voglia *porre l'accento* sul valore prognostico di un parametro:

- **Overall survival (OS):** percentuale di persone in uno studio che sono ancora vive per un certo periodo di tempo dopo la diagnosi o dall'inizio del trattamento del carcinoma.
- **Disease-free survival (DFS):** lasso di tempo dopo trattamento primario di un carcinoma in cui non si manifestano segni o sintomi della malattia.
- **Progression-free survival (PFS):** lasso di tempo in seguito al trattamento del carcinoma in cui il paziente convive con la malattia, ma questa non peggiora.
- **Disease-specific survival (DSS):** lasso di tempo definito in cui una certa percentuale di persone non sono morte a causa di una specifica malattia.

[39]

Secondo Chatterjee et al. (2019) i pazienti con OSCC in fase iniziale hanno lunghi periodi di DFS, ma alcuni soffrono di recidiva e morte dovuta alla malattia [40]. Correlando il TB al DFS e OS del paziente Almangush et al. (2015) ha riscontrato come un elevato grado di TB sia associato a prognosi peggiore e scarsa sopravvivenza (in qualsiasi stadio del tumore) [36].

1.2.3 VALUTAZIONI ISTOPATOLOGICHE

Il metodo di conteggio (*scoring)* del TB è tutt'ora un processo che richiede molto tempo, dipendente dalla personale interpretazione del patologo. L'obiettivo della ricerca è dunque quello di standardizzare, semplificare, ottimizzare i tempi, eliminare le variabilità inter/intraosservatore.

Quante cellule caratterizzano un cluster?

Il TB è definito come una singola cellula tumorale o un cluster di fino a 4 cellule tumorali - ITBCC, 2016.

La definizione di TB permette di rispondere a due domande fondamentali: Quante cellule compongono un cluster di *bud*? Qual è la differenza tra un cluster di TB e un cluster scarsamente differenziato (PDC)? Sebbene PDC e TB abbiano morfologie simili, dovuta allo stesso profilo simile ad una ghiandola, il ITBCC stabilisce che un cluster di TB debba essere composto da meno di 5 cellule, mentre il PDC considera un gruppo di cellule cancerose scarsamente differenziate maggiore o uguale a 5. La morfologia simile di questi due parametri, oltre che la localizzazione comune, potrebbero essere dovute al fatto che essi rappresentino step diversi e sequenziali di crescita tumorale [41]. Tuttavia, dalla metanalisi condotta da Almangush et al. (2018), incentrata sul ruolo prognostico del TB nei carcinomi del cavo orale, sappiamo che un cluster di 10 *bud*, come studiato da Manjula et al. (2015) e Angadi et al. (2015), non incida in maniera significativa sull'*odds ratio* dello studio, ma indebolisca il significato prognostico del TB in fase di stratificazione dei pazienti in *alto rischio* e *basso rischi*o [36].

Qual è la colorazione più adatta per il preciso conteggio dei bud?

Il TB deve essere calcolato con colorazione in Ematossilina-Eosina (H&E). - ITBCC (2016).

La maggior parte degli studi sulla valutazione del utilizzano colorazioni in H&E, colorazione diffusa e dall'ottimo rapporto costo-beneficio, solo alcuni preferiscono l'immunoistochimica (IHC) con anticorpo pancitocheratina (PK). Tuttavia, secondo l'ITBCC, quest'affermazione potrebbe subire cambiamenti nel tempo, con ulteriori ricerche: è infatti noto che l'IHC possa essere un valido aiuto nei casi dubbi, in cui i *bud* siano difficili da identificare (es. presenza di infiltrato infiammatorio peritumorale, presenza di cellule stromali reattive che "mascherano" i *bud*) per confermare la conta effettuata in H&E, nonché per lo studio della tipica trasformazione epiteliale-mesenchimale dei *bud*, come dimostrato da Wang et al. [32].

A quale ingrandimento è necessario valutare il TB?

TB deve essere valutato in un hotspot (dimensione 0.785 mm^2 del campo) a livello del Fronte di invasione Tumorale (TIF) – ITBCC 2016.

La standardizzazione del campo è di rilevanza cruciale nella pratica clinica. Secondo l'ITBCC l'area del campo in cui studiare questo parametro nel carcinoma del colon-retto deve avere un obiettivo con ingrandimento a ×20 e diametro dell'oculare 20 mm, che corrisponde a 0.785 mm^2 [32].

Da un'interessante osservazione di Chatterjee et al. (2019) è emerso che non tutte le case manifatturiere producono microscopi con ingrandimento ×20, dunque è possibile contare i bud con ingrandimento a ×40 (universalmente diffuso), considerando ≥3 bud/campo [40].

È importante inoltre capire come la dimensione tumorale presa in considerazione influisca in maniera negativa sul valore prognostico del TB: maggiore è l'area considerata, minore è il significato del parametro, dunque Pederson et al. (2017) stabilisce che nel OSCC un cluster di adeguate dimensioni

(ovvero meno di 5 cellule) ha un'area di circa 950 μm^2 (basata sulla stima che ad una singola cellula di OSCC corrisponde un'area di circa 190 μm^2) [42].

Quale area tumorale bisogna selezionare?

Per la valutazione del TB nel carcinoma del colon-retto è raccomandabile usare il metodo hotspot – ITBCC 2016.

Il metodo *hotspot* prevede la conta del TB in un singolo campione in cui ci sia la maggiore densità di *bud*. È possibile effettuare il conteggio anche usando più campi: in questo metodo dà informazioni più complete circa il fronte invasivo, inoltre sembrerebbe avere più consenso quando il conteggio viene effettuato da più individui (concordanza interosservatore). Tuttavia, il conteggio multi-campo potrebbe "diluire" la conta finale media dei casi in cui vi sono molti TB maggiormente rappresentati. Il metodo *hotspot* riflette meglio l'estensione massima del TB al TIF ed è quello raccomandato, oltre che per il fatto che è quello utilizzato dalla maggior parte degli studi. Per assicurarsi che venga preso in considerazione il campo a maggior intensità di TB, l'ITBCC consiglia di considerare 10 campi separati sul TIF prima di contare i TB nell'hotspot selezionato [32]. Nello studio di Angadi et al. viene effettuata una prima analisi a basso ingrandimento (×4), dove vengono selezionate le 5 aree di maggior intensità di TB, per poi contare i bud nelle aree selezionate a forte ingrandimento (×25) [43].

Quali sono i cut-off più efficaci in fase di stratificazione del rischio del paziente?

Insieme al conteggio andrebbe integrato una classificazione a tre livelli per facilitare la classificazione del rischio nel carcinoma del colon retto. – ITBCC, 2016.

L'intensità di TB si comporta come una variabile continua, non è possibile includere il dato rilevato in fase di conta in insiemi separati, ma idealmente occorrerebbe stilare una classificazione in base al

numero di bud rilevati (ovvero una scala continua). Secondo Pedersen et al. (2017) è possibile che la correlazione tra il conteggio dei bud come variabile continua sia un forte predittore di scarsa sopravvivenza del paziente, suggerendo una relazione dose-risposta tra TB e scarsa sopravvivenza [42]. Tuttavia, per la pratica clinica, è più semplice utilizzare uno schema ad insiemi, ovvero stabilendo dei valori soglia in cui collocare il dato rilevato (*cut-off*), a patto che questo non comporti una perdita di informazioni nei casi limite. Secondo l'ITBCC il sistema più adeguato a tale scopo è la classificazione a tre livelli proposta dalla Japanese Society fo Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) [32]:

LOW BUDDING (Bd1)	INTERMEDIATE BUDDING (Bd2)	HIGH BUDDING (Bd3)
0-4 buds	**5-9 buds**	**≥10 buds**

Tabella 7: sistema a tre livelli secondo JSCCR.

Per ridurre al minimo la frequenza dei casi limite è sempre raccomandabile associare alla classificazione il numero esatto di bud rilevati: a titolo d'esempio, una conta di 9 bud sarà classificata dome Bd2 che, seppur molto vicina, ha una prognosi diversa da una conta 10 bud Bd3 [32]. Nello studio del OSCC i ricercatori hanno spesso selezionato arbitrariamente i *cut-off* in cui classificare il TB. Secondo Wang et al. (2011), e Almangush et al. (2017) la stratificazione dei TB (bud index) comprende due sole categorie: basso TB (<5 bud/campo), alto TB (≥5 bud/campo). Al contrario, Manjula et al. (2015) e Angadi et al. (2015) hanno invece utilizzato una soglia di 10 bud/campo per dividere i pazienti in basso (<10 bud/campo) e alto rischio (≥ 10 bud per campo), secondo l'indice di Ueno et al. e Shinto et al [36]. Nonostante l'associazione tra TB e metastasi linfonodale sia comunque un dato significativo e conclamato, l'inclusione di alcuni casi di un numero di bud ≥5/campo,

classificati impropriamente come “a basso rischio”, diminuisce il valore prognostico del TB [36,43,44].

Lo studio di N. Xie et al. (2019) ha però rilevato i pazienti classificati come Bd2 e Bd3, non presentavano differenze sostanziali in termini di OS, suggerendo che i cut-off stabiliti dall’ITBCC non possano essere usati per classificare in maniera chiara i pazienti affetti da OTSCC. Tuttavia, il TB è apparso essere un fattore prognostico molto forte, tanto che metodi di conta differenti producono simili risultati [38].

I vantaggi del Digital Tumor Bud Count (DTBC)

Il conteggio (scoring) “ad occhio nudo” del numero di bud non è esente da errori: esiste una certa discordanza fra quando un campione bioptico viene analizzato da più di una figura (concordanza inter-osservatore) o semplicemente quando la conta viene ripetuta dalla stessa persona (concordanza intra-osservatore). Negli studi viene posto anche particolare accento sulla differente abilità di scoring tra patologi con diverso grado di esperienza nella ricerca, poiché un patologo meno esperto tende ad osservare meno *bud*, indipendentemente dalla colorazione utilizzata, a meno che non venga opportunamente istruito [45].

Grazie all’utilizzo del Digital Tumor Bud Count (DTB) di Pedersenet al. (2017), un algoritmo semiautomatico di analisi dell’immagine, è possibile risolvere i problemi relativi ai differenti metodi di scoring, arbitrariamente decisi in ogni studio (come emerso nella review di Almangush et al., 2015), semplificare e standardizzare la conta dei bud, ridurre i tempi, eliminare la soggettività dello studio del campione [42].

Il limite principale di questa tecnologia è che ha bisogno di essere eseguita in campioni colorati con IHC: il software non è infatti in grado di eseguire l’analisi con colorazione H&E; l’IHC non è una

colorazione utilizzata di routine nei campioni di OSCC, inoltre è una scelta che vanificherebbe il tentativo di includere il parametro TB nei resoconti patologici richiesti di routine, basati appunto sulla valutazione dei casi in H&E. In questo modo non è possibile valutare il ruolo prognostico del TB se non prima della terapia chirurgica, allungando in questo modo i tempi [42].

Inoltre, il margine di errore non è eliminato completamente: questa tecnologia è infatti semi-automatica, dunque è fondamentale avere a disposizione un patologo con adeguata preparazione che si occupi di effettuare un'accurata ricerca della massa tumorale con l'invasione più profonda e che riesca a delineare l'area tumorale da far analizzare al software [42].

Trasformazione epiteliale-mesenchimale (EMT) del TB

Il pattern di invasione (POI) è un tratto distintivo del OSCC, responsabile della progressione e metastasi. Il TB è un parametro di cui tener conto nello studio del POI e sembrerebbe il responsabile del comportamento aggressivo del OSCC, in quanto coinvolto nella degradazione del connettivo peritumorale, evasione della risposta dell'ospite e invasione linfonodale e vascolare, portando a metastasi locale e a distanza. Questo comportamento potrebbe essere dovuto ad una trasformazione epiteliale-mesenchimale (EMT), meccanismo critico nell'acquisizione da parte di cellule epiteliali a prognosi infausta di un fenotipo maligno [43, 46].

La EMT è associata ad un'espressione alterata di alcuni fattori, che comportano distinti cambiamenti nella cellula, fra cui: perdita di adesione cellula-cellula, de-differenziazione, morfologia simil-fibroblastica, espressione alterata di determinati geni [36,46].

Wang et al. (2011) ha dimostrato come l'espressione di E-caderina (componente chiave delle giunzioni aderenti) a livello del TIF e TB di OTSCC sia molto minore rispetto alla porzione centrale/superficiale del tumore, che aveva comportamento simile all'epitelio sano adiacente al tumore preso come controllo. L'espressione della Vimentina ha un comportamento inverso alla E-

Caderina: aumento della sua espressione lungo il TIF e TB, ma poco rappresentata o non rappresentata affatto a livello dell'epitelio di controllo o nelle porzioni superficiali/centrali del campione. La produzione di E-caderina risulta ridotta significativamente, accompagnata da un'aumentata espressione di Vimentina a livello dei TIF e del TB [36]. Questi dati dimostrano che le cellule del TB sono andate incontro a EMT e che questo si traduce in un potenziale metastatico aumentato [36].

Correlazione TB e Profondità di invasione

Lo studio del pattern di invasione del tumore è stato approfondito in modi differenti, incluso il TB e il worst pattern of invasion (WPOI). Il WPOI è stato introdotto come parte di un modello di rischio istologico ed è un utile marker prognostico nei OTSCC in stadio precoce. Tuttavia, di fronte alla presenza di tumori satelliti, ovvero piccole masse tumorali poste a circa 1mm dalla massa tumorale principale, lo studio deve necessariamente includere ogni singolo satellite, dunque il WPOI risulta uno strumento poco efficace e non funzionale alla pratica clinica [44].

Secondo gli studi di Almangush et al., è possibile sfruttare l'interessante correlazione tra la presenza di bud (B) e la profondità di invasione del tumore (D): questi due parametri, appaiono spesso come fattori prognostici indipendenti di metastasi linfonodale e recidiva nel OSCC. Lo scopo dello studio è quello di dimostrare come il modello Budding Depth (BD) (ricavato dalla combinazione dei parametri indipendenti B e D) possa stratificare adeguatamente i pazienti ad alto e basso rischio, con una concordanza tra biopsia preoperatoria e campione resettivo postoperatorio [44].

I campioni su cui è possibile effettuare il conteggio del TB comprendono le biopsie effettuate in fase di diagnosi e valutazione della prognosi prima della terapia chirurgica (biopsie preoperatorie), ma anche campioni ricavati postumi all'eradicazione chirurgica della massa tumorale (campione resettivo postoperatorio).

Il confronto tra questi due tipi di campioni permette di validare l'efficacia del metodo utilizzato per categorizzare il paziente e confermare dunque la qualità del TB come valore prognostico. Secondo lo schema a tre livelli di Almangush et al. (2018), è possibile classificare i pazienti in tre livelli, in accordo con quanto descritto dal precedente studio nel 2015 e anche le raccomandazioni dell'ITBCC:

Score 0	Score 1	Score 2
<5 Bud al TIF e <4 mm Depth	≥5 Bud al TIF oppure ≥4 mm Depth	≥5 Bud al TIF e ≥4 mm Depth

Tabella 8: Sistema a tre livelli modello BD di Almangush et al. (2018)

Dai risultati emersi dalla piccola coorte di pazienti considerata, la valutazione dei B preoperatori ha dimostrato una buona sensibilità (59%) e un'alta specificità (100%) nel predire la successiva misurazione postoperatoria. Per quanto riguarda la D il 77% dei campioni presentano stessa profondità sia pre- che postoperatoria, con una sensibilità del 77,1% e specificità del 76,7% che il campione preoperatorio riesca a predire la misurazione nel postoperatorio. Il modello istopatologico BD mostra una relazione significativa molto alta tra le misurazioni pre- e postoperatorie, con un 57,1% di sensibilità e 96,9% di specificità. Esiste una relazione significativa tra lo *scoring* del BD nei campioni pre- /postoperatori. Questi risultati sono molto utili nelle decisioni di trattamento nei carcinomi in fase iniziale con comportamento altamente aggressivo. L'utilizzo del modello BD nella pratica clinica di routine potrebbe diventare uno strumento prognostico che riesca a superare i difetti del TNM e il *grading* istologico [44].

Lo studio ha dimostrato come il valore di D abbia una certa concordanza quando i campioni vengono suddivisi nelle due categorie "invasione superficiale" (<4mm) e "invasione profonda" (≥4mm), ma questa correlazione viene persa quando si confrontano i campioni preoperatori con i postoperatori. Questo perché il campione postoperatorio consente di poter studiare il tumore su più fronti, rispetto

ad una biopsia preoperatoria in cui abbiamo un limitato numero di fronti e la qualità scarsa del campione potrebbe non aver incluso il margine più profondo. Per questi motivi, l'uso del modello BD pre-/postoperatorio è utile solo per poter interpretare un quadro preoperatorio poco chiaro. Tra le accortezze da prendere in fase di raccolta del campione bioptico ricordiamo che:

- Le sezioni preoperatorie tagliate e congelate fresche hanno sicuramente concordanza maggiore con lo studio postoperatorio, questo ci fa pensare che in questo modo sia possibile ridurre l'inaccuratezza delle misurazioni fatte in biopsia preoperatoria.
- È necessaria che la biopsia abbia dimensioni 4mm larghezza x 4 mm profondità che includa la porzione più profonda del tumore per permettere al patologo uno studio accurato. Quindi se si usa la giusta colorazione, la giusta dimensione la biopsia preoperatoria comporta una concordanza nel modello BD con la postoperatoria.

Il modello BD è un parametro promettente che ha bisogno di essere applicato in uno spettro più variegato di OSCC e richiede una qualità di campioni elevata che non sempre è possibile raggiungere [44].

1.2.4 ILVALORE PROGNOSTICO DEL TB

Fattore prognostico indipendente di metastasi e sopravvivenza

Secondo le raccomandazioni dell'ITBCC il TB è un predittore indipendente di metastasi linfonodale e di sopravvivenza nei carcinomi del colon-retto in stadio iniziale (pT1), dunque è fortemente raccomandato includerlo nei resoconti patologici richiesti di routine, assieme all'invasione linfo-vascolare, il livello e la profondità di invasione del tumore [32]. Grazie all'analisi multivariata di Angadi et al. (2015) sappiamo la profondità di invasione e TB sono predittori indipendenti di metastasi linfonodale nel OSCC [40].

Secondo l'ITBCC il comportamento dei carcinomi del colon-retto di stadio II è molto più ambiguo rispetto ad un conclamato stadio III, dove la chemioterapia adiuvante è un trattamento mandatorio per scongiurare recidive e progresso del tumore. Il trattamento dei carcinomi in stadio II, che può includere la chemioterapia adiuvante in alcuni casi, è di difficile inquadramento, specie quando non sono inclusi altri fattori di rischio: è dunque raccomandabile valutare il TB, per il suo valore predittivo di metastasi e sopravvivenza nei carcinomi del colon-retto di stadio II. L'ITBCC raccomanda di includere il TB nei fattori ad alto rischio [32].

Lo studio di Wang et al. (2011) ha dimostrato il significato prognostico del TB in un piccolo campione di individui (133 casi) che avevano già ricevuto terapia chirurgica (rimozione del tumore primario e svuotamento linfonodale totale). Grazie ad una semplice rappresentazione grafica OS/tempo successivo alla chirurgia, appare chiaro come il tasso di sopravvivenza a cinque anni dei pazienti ad alto indice di TB sia nettamente inferiore rispetto a quelli con basso indice di TB [36]. L'utilizzo di un algoritmo matematico, come la DTBC, permette inoltre di valutare in maniera più precisa l'OS e la PSF del paziente rispetto ad alte variabili clinico-patologiche [42]. Dallo studio di Xie et al. (2019)

emerge come l'OS diminuisce in maniera significativa nei soggetti con *budding index* intermedio (Bd2) ed elevato (Bd3), rispetto ad un *budding index* di bassa intensità (Bd1) [38].

Il TB è un fattore prognostico di metastasi linfonodale

Il TB è correlato a metastasi linfonodale. - ITBCC, 2016.

Una elevata conta di TB a livello del Fronte di Invasione Tumorale (TIF) di OSCC è correlata a prognosi peggiore ed elevato rischio di metastasi. Più precisamente, la regione con maggior numero di *bud* a livello del TIF in un campione prelevato nel post-operatorio viene definito *Peritumoral Tumor Budding* (PTB) [43]. La pratica clinica ha dimostrato che il conteggio dei *bud* può, in alcuni casi, risultare difficoltoso, in quanto il campione bioptico potrebbe non comprendere quest'area [32, 43]. Dunque, si è indagato sul valore de l'*Intratumoral Tumor Budding* (ITB), ovvero la presenza di TB nella massa tumorale maggiore o tra due isole tumorali in una biopsia preoperatoria [36,43]. Lo studio del ITB potrebbe rappresentare una nuova modalità di valutazione della prognosi, grazie all'utilizzo di campioni prelevati contemporaneamente al trattamento chirurgico, piuttosto che una biopsia. Nonostante l'ITB abbia una correlazione lineare con il PTB, non vi sono sufficienti evidenze scientifiche che suggeriscano la sua segnalazione nei report patologici del paziente [32,36,43]. Di contro, lo studio di Almangush et al. (2014) ha dimostrato che la conta del PTB potrebbe dimostrarsi un valido aiuto nello studio del comportamento biologico EMT tipico dei carcinomi del testa-collo [46].

Una delle osservazioni più importanti riscontrate da Almangush et al. (2015), confermata anche da Chatterjee et al. (2019) è la forte correlazione tra l'elevata intensità di TB e la presenza di metastasi linfonodali e metastasi a distanza: questo ci porta a dedurre che il TB potrebbe rappresentare uno degli step che precedono la manifestazione di metastasi [36]. Secondo Xie et al. (2019) esiste una correlazione tra alta intensità di TB e OSCC in stadio precoce con metastasi occulte: ipotizzando di

effettuare lo studio su un campione di individui più elevato è possibile avvalorare questa importante correlazione.

Metastasi occulte in stadio precoce: le opzioni terapeutiche.

La probabilità di metastasi linfonodali viene solitamente valutata effettuando una semplice biopsia in un linfonodo-sentinella: in pazienti con OSCC in stadio precoce è possibile riscontrare metastasi linfonodali occulte nel 30% dei casi [42]. Il vantaggio dello studio del *bud index* è quello di sfruttare la semplicità e l'elevato costo beneficio del TB per studiare in maniera approfondita la prognosi di pazienti con tumori in stadio T1/2cN0 al fine di scongiurare la presenza di eventuali metastasi occulte. Il trattamento di questi pazienti prevede inevitabilmente, due opzioni: Dissezione Linfonodale Elettiva (END) associata a radioterapia adiuvante, oppure *watchful waiting* [38,43].

La END è una tecnica chirurgica che comprende l'asportazione selettiva di linfonodi in cui vi è un enorme rischio di metastasi microscopiche, che sfuggono all'osservazione clinica e alle tecniche di imaging. La tecnica si basa sul presupposto scientificamente dimostrato che le metastasi linfonodali seguano un pattern di diffusione entro certi limiti preciso e prevedibile. Ciononostante, la comunità scientifica non ha raggiunto un accordo sulla sua efficacia [38,47]. La tecnica *watchful waiting* consiste nel monitoraggio costante del paziente, nessun trattamento chirurgico viene effettuato se non prima dello sviluppo di sintomi o cambiamento di specifici parametri misurabili. Grazie allo studio di Pedersen et al. (2017) è stato possibile capire quanto sia importante il TB nella selezione dei candidati ideali per la chirurgia: la probabilità di avere un beneficio netto intervenendo chirurgicamente sulla base di un modello, una curva che rappresenta l'analisi multivariata effettuata su vari aspetti clinico-patologici del tumore, è molto più alta quando viene incluso il TB, piuttosto che la profondità di invasione assoluta del tumore [42].

Il TB deve essere tenuto in considerazione assieme ad altri fattori clinico-patologici in un approccio multidisciplinare - ITBCC, 2016.

Nel carcinoma del colon-retto il *grading* istologico, l'invasione vascolare e perineurale informano, assieme al TB, sul comportamento biologico del tumore, ed è per questo che l'ITBCC raccomanda di riportare questo parametro nei report patologici [32]. Questo non è estensibile al OSCC: secondo Angadi et al. (2015) questi parametri clinico-patologici sono sì associati ad un'elevata presenza di TB, ma non raggiungono un significato statistico rilevante, se considerati da soli [42,43].

Dall'analisi univariata di Pedersen at al. (2017) alcune caratteristiche clinico-patologiche fra cui (oltre quelle già citate): le caratteristiche del TIF (coesivo/non coesivo), sede del tumore, età, genere, quantità di tabacco assunto, non predicono (quando considerate da sole) la presenza di metastasi linfonodale [42]. Pedersen et al. (2017) ha dimostrato con un'analisi multivariata di tutti questi elementi come sia possibile creare una modello che dimostri come il TB predica con maggiore probabilità la presenza di metastasi linfonodali di altre variabili continue (es. la profondità di invasione): l'utilizzo di questo modello permette di scovare idealmente 27 metastasi occulte ogni 100 pazienti, senza il bisogno di effettuare alcuna terapia chirurgica non necessaria. Con un 10% di probabilità di manifestare metastasi linfonodali il modello Pedersen riduce l'overtreatment chirurgico ogni 13 pazienti su 100 affetti da OSCC in stadio cN0 [42].

Dallo studio di Xie et al. (2019) emerge che correlando il numero di TB e il sesso, l'età, la classificazione T non vi è alcuna differenza, ma il TB è associato in maniera significativa con metastasi linfonodali, differenziazione, infiltrazione linfonodale, recidiva, pattern invasivo e profondità di invasione. Inoltre, la profondità di invasione è altresì significativamente associata allo stadio T [38]. Anche secondo Wang et al. (2011) esiste una forte correlazione tra l'intensità dei TB e la dimensione del tumore, differenziazione cellulare, stadio clinico, metastasi linfonodale [38].

Il TB e il grading istologico non sono la stessa cosa. – ITBCC, 2016.

Il *grading* istologico indica il grado di differenziazione del tumore, la sua crescita e la sua aggressività, ma è indipendente dal valore prognostico del TB: secondo l'ITBCC sono dunque due parametri sono differenti [32].

Il TB dovrebbe essere incluso nelle guideline/protocolli che valutano il tumore del colon-retto – ITBCC, 2016.

Nel tempo la ricerca ha proposto diverse caratteristiche del tumore per valutare la prognosi del OSCC, come l'espressione di alcuni geni, la profondità del tumore, e il WPOI. Nessuno di questi valori è stato integrato nella pratica clinica, per l'evidente svantaggio costo-beneficio di alcuni, mancanza di evidenza scientifica in altre e altre ancora per lo spreco di tempo dovuto a metodi di valutazione complessi [42], mentre TB è correlato a metastasi linfonodale, scarsa sopravvivenza e può essere utilizzato come fattore prognostico indipendente. Negli stadi clinici considerati come precoci il *bud index* può aiutare a identificare quei pazienti che possano ricevere beneficio da una terapia di tipo chirurgico. La conta del TB, sulla base metodo dell'ITBCC è, secondo Xie et al. (2019), riproducibile, affidabile, facilmente praticabile [38].

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO

Il carcinoma squamo-cellulare della lingua (OTSCC) è il tumore maligno più comune del cavo orale. L'odierno sistema di stadiazione per il carcinoma del cavo orale si basa sulla ottava edizione del manuale AJCC sulla stadiazione del cancro, che prende in considerazione nuovi marker prognostici morfologici come la profondità di invasione e l'estensione extra-nodale. Sebbene siano stati proposti numerosi marker per la pronosticazione di questo tumore, nessuno di questi è stato approvato nella pratica di routine. Per queste ragioni, nonostante i recenti vantaggi nei sistemi diagnostici e terapeutici, la prognosi del OTSCC è infausta e spesso non predicibile.

Nella ricerca di nuovi marcatori prognostici del carcinoma orale si è deciso di prendere in considerazione un fattore morfologico, il TB, per valutarne la rilevanza prognostica. Il TB si riferisce a un piccolo cluster di cellule cancerose (1-4 cellule) ed è stato recentemente segnalato come un fattore prognostico affidabile in numerosi tumori. Inoltre, Elseragy et al. hanno proposto recentemente l'integrazione di questo marker morfologico nel sistema di grading del WHO del OTSCC. In particolare, il TB è stato preso in considerazione per migliorare il sistema di grading corrente [48].

Lo studio è stato condotto sull'OTSCC in virtù del fatto che questo rappresenta un gruppo estremamente omogeneo di tumori del cavo orale, quindi di più facile osservazione. Il TB è stato valutato su fette di tessuto tumorale colorate mediante ematossilina-eosina, un tipo di tecnica utilizzata routinariamente nei laboratori di anatomia patologica, rappresentando un metodo di indagine rapido ed economico.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI

Il presente studio retrospettivo ha esaminato una coorte di pazienti selezionati in maniera casuale con OTSCC che sono stati trattati con intento curativo presso il Dipartimento di Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Ospedale Generale "Ospedali Riuniti" (Ancona, Italia), tra il 1997 e il 2014. I dati clinici e patologici sono stati prelevati dagli archivi delle Sezioni di Patologia, Università Politecnica delle Marche, Italia. I criteri di inclusione sono stati: (a) OTSCC primario; (b) età superiore a 18 anni; (c) nessuna chemioterapia o radioterapia preoperatoria né chemioterapia adiuvante; (d) nessuna infezione da papillomavirus umano (HPV); (e) follow-up di almeno 3 anni in pazienti vivi. I criteri di esclusione sono stati: (a) casi OTSCC che coinvolgono diversi siti anatomici e dove non è stato possibile identificare il sito esatto da cui ha avuto origine il tumore; (b) OTSCC primario recidivante o secondario; (c) pazienti affetti da OTSCC con morte postoperatoria. Le classificazioni pTNM sono state riviste da 2 patologi esperti secondo la settima e ottava edizione dell'AJCC Cancer Staging Manual [49] e la quarta edizione della classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) dei tumori della testa e del collo [50]. I follow-up sono stati eseguiti per via telefonica da un singolo chirurgo, in cieco sui dati clinici e patologici e sull' assegnazione del gruppo. Gli endpoint clinici esaminati sono stati la sopravvivenza specifica per malattia (DSS), la sopravvivenza globale (OS) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS). Il tempo di follow-up è stato calcolato dalla data dell'intervento chirurgico alla data di ricomparsa della malattia (per DFS), alla data di morte per tumore (per DSS) o morte per qualsiasi causa (OS), o alla data dell'ultima visita senza ricomparsa della malattia.

3.2 VALUTAZIONE ISTOLOGICA E PROPOSTA DI GRADING

Sono state eseguite sezioni standard da 4 μm colorate con ematossilina-eosina (HE) ottenute da blocchi fissati con formalina, inclusi in paraffina dei campioni di tumore primario. Due patologi esperti hanno eseguito la valutazione istologica in maniera indipendente, in cieco sui dati clinici e patologici. Le sezioni sono state eseguite a partire dalla zona più invasiva dell'OTSCC (le stesse sezioni utilizzate per valutare lo stato T). L'area col maggior numero di TB è stata conteggiata ad alto ingrandimento (x20), come precedentemente descritto. È stato impiegato un sistema numerico (Grado Rivisitato I, II, III) per rendere il lavoro più semplice al patologo rispetto all'utilizzo della nostra nomenclatura descrittiva (ben differenziato coesivo, ecc.). Il TB è stato incluso nel sistema di grading del WHO come descritto nei successivi paragrafi.

Tumore Ben Differenziato Coesivo (Grado I Rivisitato)

Tessuto tumorale (e singole cellule tumorali) che ricorda cellule epiteliali squamose nella mucosa orale sana. Il tumore contiene focolai di cheratinizzazione extracellulare o intracellulare. Le cellule hanno poche figure mitotiche e raramente mostrano pleomorfismo nucleare o una variazione nella forma e nella grandezza. Mitosi atipiche sono rare o assenti. Il TB è assente.

Tumore Moderatamente Differenziato e/o Leggermente Dissociato (Grado II Rivisitato)

Le cellule tumorali sono meno cheratinizzate con maggior pleomorfismo nucleare o una variazione nella forma e nella grandezza della cellula. Potrebbero essere riscontrate alcune figure mitotiche atipiche. In alternativa, il tumore potrebbe presentare alcuni tumor buds (ovvero un numero di bud ≤ 4).

Tumore Scarsamente Differenziato e/o Tumore Dissociato (Grado III Rivisitato)

Cellule tumorali raramente cheratinizzate con frequenti figure mitotiche, incluse quelle atipiche. Pleomorfismo nucleare e variazione nella forma e nella grandezza della cellula generalmente visibili. Indipendentemente dalle caratteristiche istologiche, i tumori con 5 o più bud sono stati classificati come Grado III Rivisitato.

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite usando i software IBM SPSS Statistics versione 24. Le associazioni tra il grado da noi proposto e l'età, sesso, stadio cTNM, invasione perineurale o il grado WHO del paziente sono state analizzate con una tabulazione incrociata e un χ^2 test. Per la sopravvivenza malattia-specifica (DSS), per il grado WHO e il grado da noi proposto sono state costruite delle curve di Kaplan-Meier.

Il log-rank test è stato usato per valutare le differenze di sopravvivenza tra i gruppi. Il modello di azzardo proporzionale di Cox è stato usato per condurre l'analisi della sopravvivenza e con adattamento per i fattori confondenti. L'Hazard Ratio (HR) è stata riportata con un 95% di Intervallo di Confidenza (CI) per tutti i modelli.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 DATI CLINICO-PATOLOGICI

La coorte di soggetti analizzata in questo studio retrospettivo è costituita da 154 pazienti di cui 94 sono uomini e 60 donne, con età media di 64,2 anni (deviazione standard di 14,3). In questi pazienti è stato analizzato anche il livello di stadiazione patologica (TNM) del tumore; i risultati sono stati 48 pazienti allo stadio 1, 35 allo stadio 2, 36 allo stadio 3 e 35 allo stadio 4. Tutte le informazioni clinicopatologiche sono riassunte nella tabella 9.

Per quanto riguarda il grading patologico tradizionale, la frequenza riscontrata è stata per 22 pazienti con grado 1, 81 con grado 2 e 43 con grado 3, per un totale di 146 pazienti con valutazione istologica; per altri 8 pazienti non è stata possibile tale valutazione.

Dopo aver applicato il sistema di classificazione del grading proposto da Elseragy et al. (*modified Grading*, mG), in cui viene incluso il numero dei buds tumorali al fine di determinare il grading patologico (Figure 14, 15 e 16), la frequenza riscontrata nella stessa coorte di 146 casi è stata di 8 pazienti di grado 1, 64 pazienti di grado 2 e 74 di grado 3.

Dati clinico-patologici	**N° di pazienti (%)**
Età	
≤ 65 anni	81 (52,6%)
> 65 anni	73 (47,4%)
Media (± DS)	64,2 ± 14,3
Sesso	
Uomo	94 (61,0%)
Donna	60 (39,0%)
Stadio patologico	
I	48 (31,2%)
II	35 (22,7%)
III	36 (23,4%)
IV	35 (22,7%)
Grading tradizionale	
G1	22 (15,1%)
G2	81 (55,5%)
G3	43 (29,5%)
Grading modificato	
mG1	8 (5,5%)
mG2	64 (43,8%)
mG3	74 (50,7%)

Tabella 9. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti inclusi nel presente studio.

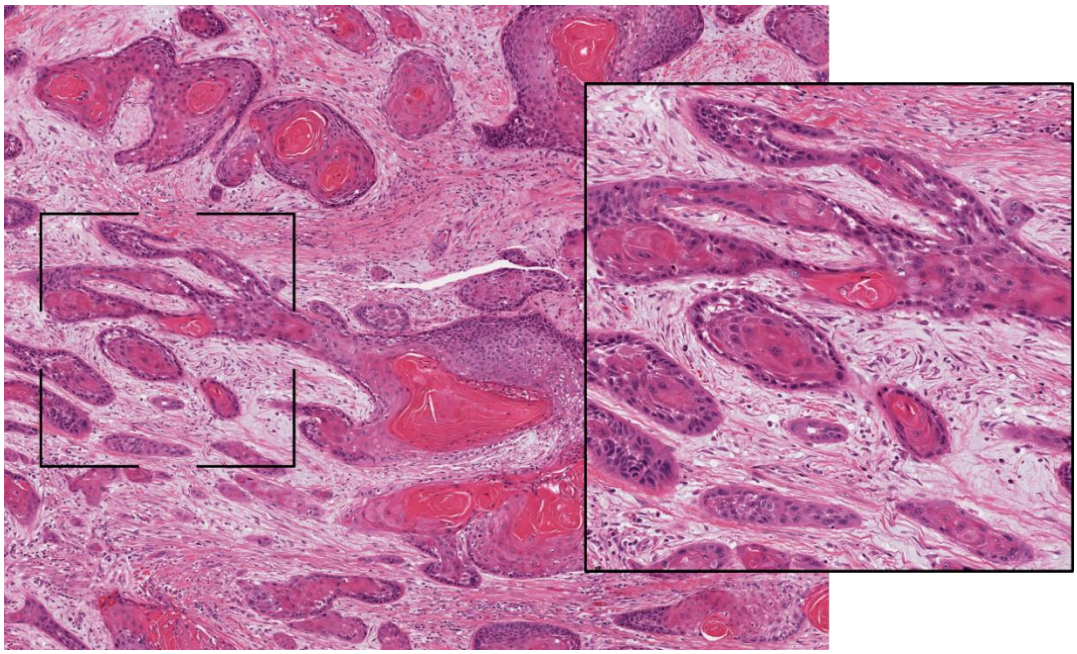


Figura 14. Immagine rappresentativa del fronte infiltrativo di un carcinoma della lingua in cui si evidenzia l'assenza di buds tumorali.

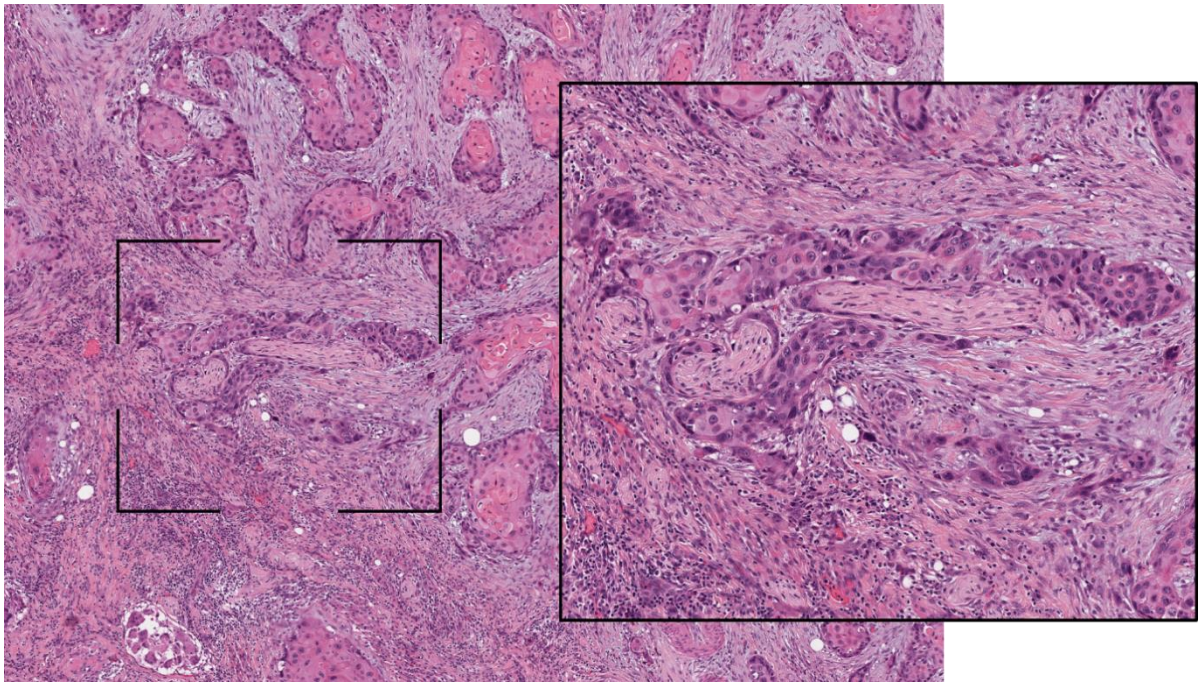


Figura 15. Immagine rappresentativa del fronte infiltrativo di un carcinoma della lingua in cui si evidenzia la presenza di un numero di buds tumorali ridotto, compreso tra 1 e 4.

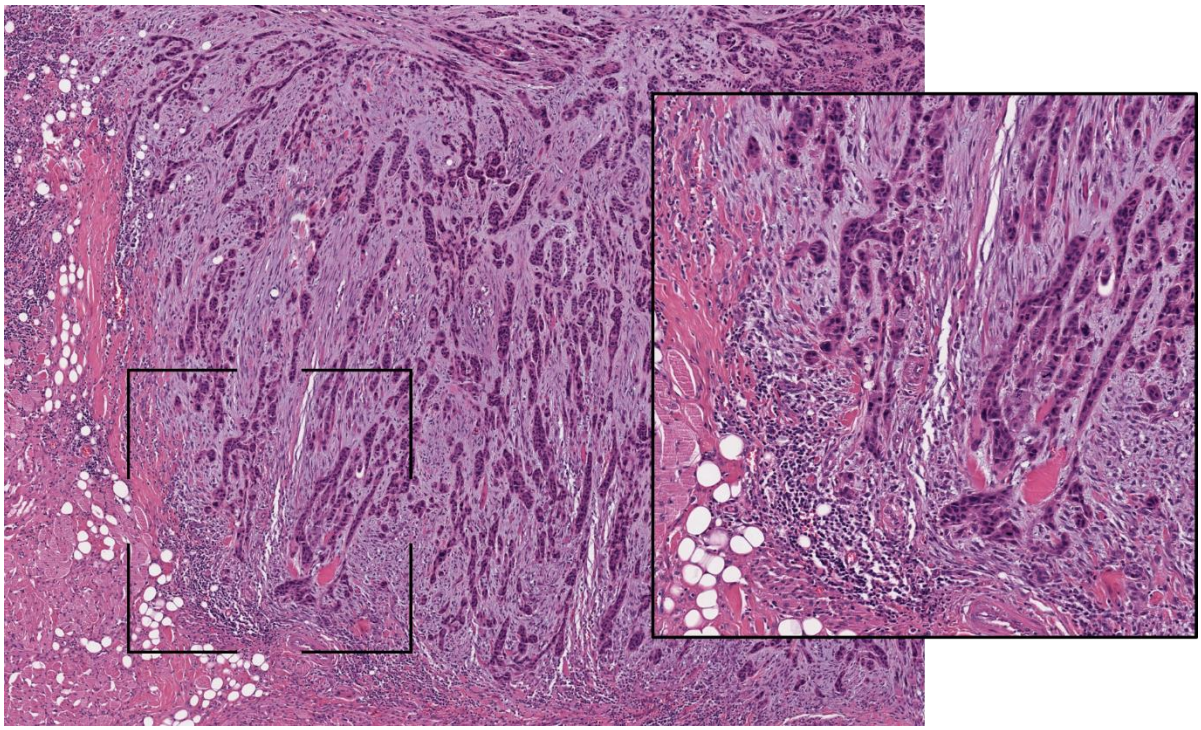


Figura 16. Immagine rappresentativa del fronte infiltrativo di un carcinoma della lingua in cui si evidenzia la presenza di un elevato numero di buds tumorali (≥5).

È stata condotta un'analisi di Spearman, un'analisi statistica di tipo non parametrico usata per correlare età, grading e staging. Dall'analisi è anche risultato che sia il grading tradizionale che quello modificato correlano con l'aumento dello stadio patologico ($p<0.0001$) (Tabella 10).

Correlazioni					
			Stadio	*mG*	*Grading*
Rho di Spearman	*Stadio*	Coefficiente di correlazione	1	0,354**	0,338**
		Significatività	-	< 0,0001	< 0,0001
		N	154	146	146
	mG	Coefficiente di correlazione	0,354**	1	0,634**
		Significatività	< 0,0001	-	< 0,0001
		N	146	146	146
	Grading	Coefficiente di correlazione	0,338**	0,634**	1
		Significatività	< 0,0001	< 0,0001	-
		N	146	146	146

** La correlazione è significativa a livello 0,01 (a due code).

Tabella 10. Correlazioni tra grading tradizionale, grading modificato e stadio patologico con analisi di Spearman.

4.2 ANALISI UNIVARIATA DI SOPRAVVIVENZA E RECIDIVA

Sono state eseguite analisi univariate per verificare se il grading modificato possa influire sulla sopravvivenza e la recidiva in modo maggiore rispetto al grading tradizionale.

Nella figura 17 è rappresentata l'analisi di Kaplan-Meier, un tipo di analisi univariata, prendendo in considerazione il sistema di grading tradizionale (Tabella 11). Dal grafico è evidente che il sistema

di Grading tradizionale sembra influire negativamente sulla sopravvivenza totale, sebbene questa tendenza non raggiunga una significatività statistica (Log-rank test: 5,394; p = 0.067). Nella figura 18 è mostrato lo stesso tipo di analisi considerando il sistema di grading modificato (mG) (Tabella 12). Come risulta evidente dal grafico il sistema mG fa variare in maniera negativa il tasso di sopravvivenza e questa differenza è significativa (Log-rank test: 14,385; p = 0.001).

L'analisi di Kaplan-Meier inoltre è stata importante per valutare il verificarsi di recidiva dopo la resezione dei carcinomi della lingua in relazione ai sistemi di grading. In figura 19 è rappresentata l'analisi di Kaplan-Meier sul rischio di recidiva prendendo in considerazione il sistema di grading tradizionale (Tabella 13). Dal grafico non si evince una differenza significativa riguardo il rischio di recidiva rispetto al grading tradizionale (Log-rank test: 2,655; p = 0,265). In figura 20 è invece riportata l'analisi di Kaplan-Meier sul rischio di recidiva prendendo in considerazione il sistema mG (Tabella 14). Anche in questo caso non emergono differenze significative, suggerendo un rischio di andare incontro a recidive sovrapponibile tra i vari livelli di grading (Log-rank test: 4,481; p = 0,106).

Medie e mediane per tempo di sopravvivenza								
Grading tradizionale	**Media**				**Mediana**			
	Stima	Errore standard	I.C. del 95%		Stima	Errore standard	I.C. del 95%	
			lim. inf.	lim. sup.			lim. inf.	lim. sup.
1	75,4	10,4	55,0	95,7	84,0	39,2	7,1	160,9
2	79,6	5,4	69,0	90,1	100,0			
3	60,2	7,1	46,4	74,1	55,0	11,9	31,7	78,3
Globale	73,4	4,0	65,5	81,4	84,0	15,6	53,5	114,5

Tabella 11. Valori di medie e mediane di sopravvivenza globale in base al sistema di grading tradizionale.

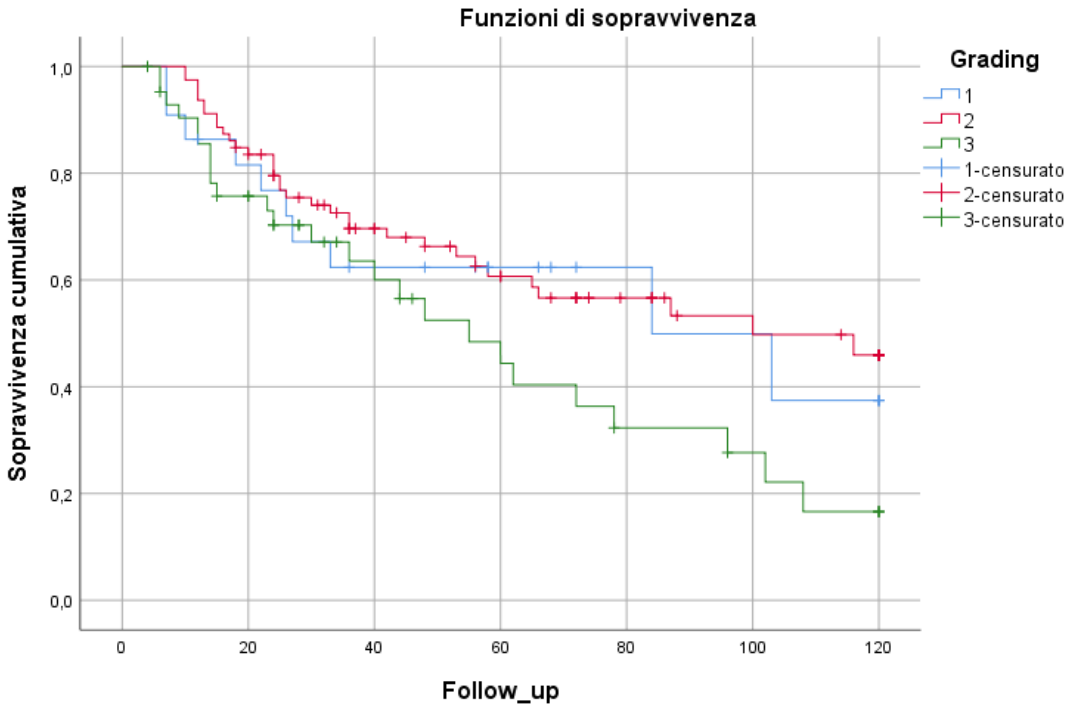


Figura 17. Analisi di Kaplan-Meier su tassi di sopravvivenza prendendo in considerazione il grading tradizionale.

Medie e mediane per tempo di sopravvivenza								
Grading modificato	**Media**				**Mediana**			
	Stima	Errore standard	I.C. del 95%		Stima	Errore standard	I.C. del 95%	
			lim. inf.	lim. sup.			lim. inf.	lim. sup.
1	45,4	5,5	34,6	56,3	-	-	-	-
2	89,5	5,4	78,8	100,2	-	-	-	-
3	58,4	5,6	47,5	69,3	48,0	11,8	24,8	71,2
Globale	73,4	4,0	65,5	81,4	84,0	15,6	53,5	114,5

Tabella 12. Valori di medie e mediane di sopravvivenza globale in base al sistema mG.

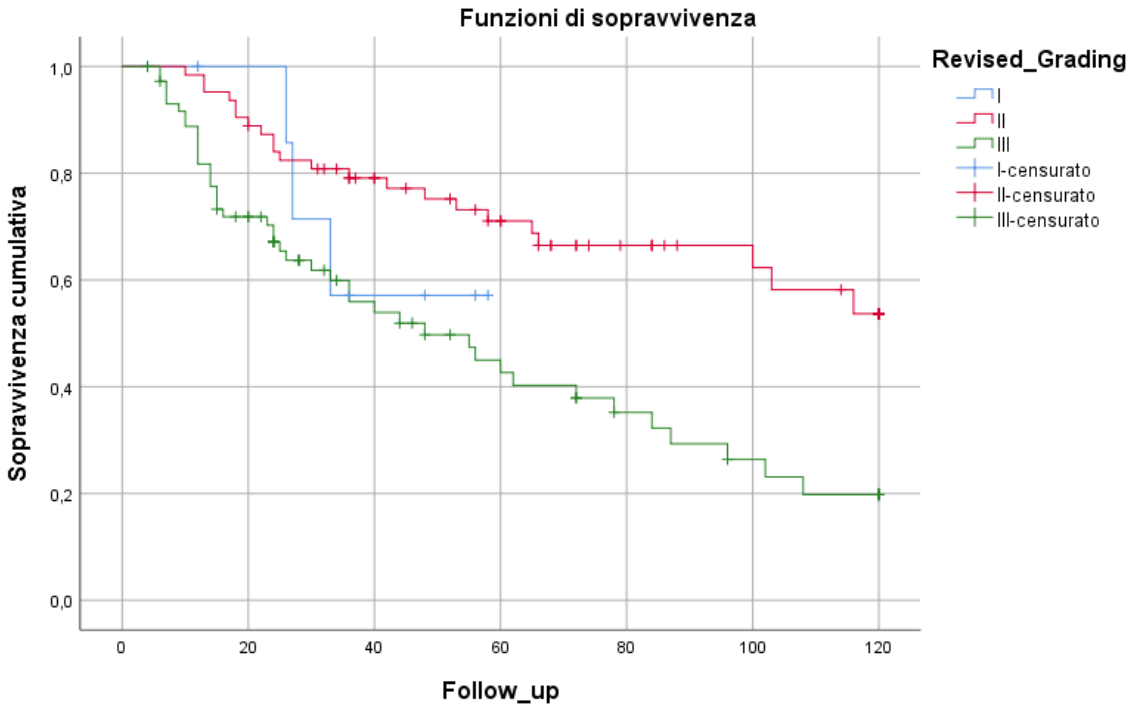


Figura 18. Analisi di Kaplan-Meier su tassi di sopravvivenza prendendo in considerazione il sistema mG.

Medie e mediane per tempo libero da recidive								
Grading tradizionale	**Media**				**Mediana**			
	Stima	Errore standard	I.C. del 95%		Stima	Errore standard	I.C. del 95%	
			lim. inf.	lim. sup.			lim. inf.	lim. sup.
1	94,8	11,2	72,9	116,8	-	-	-	-
2	73,0	6,1	61,1	84,9	104,0	-	-	-
3	67,4	9,3	49,2	85,7	72,0	27,0	19,2	124,8
Globale	75,6	4,7	66,5	84,8	104,0	23,8	57,3	150,7

Tabella 13. Valori di medie e mediane del tempo libero da recidive in base al sistema di grading tradizionale.

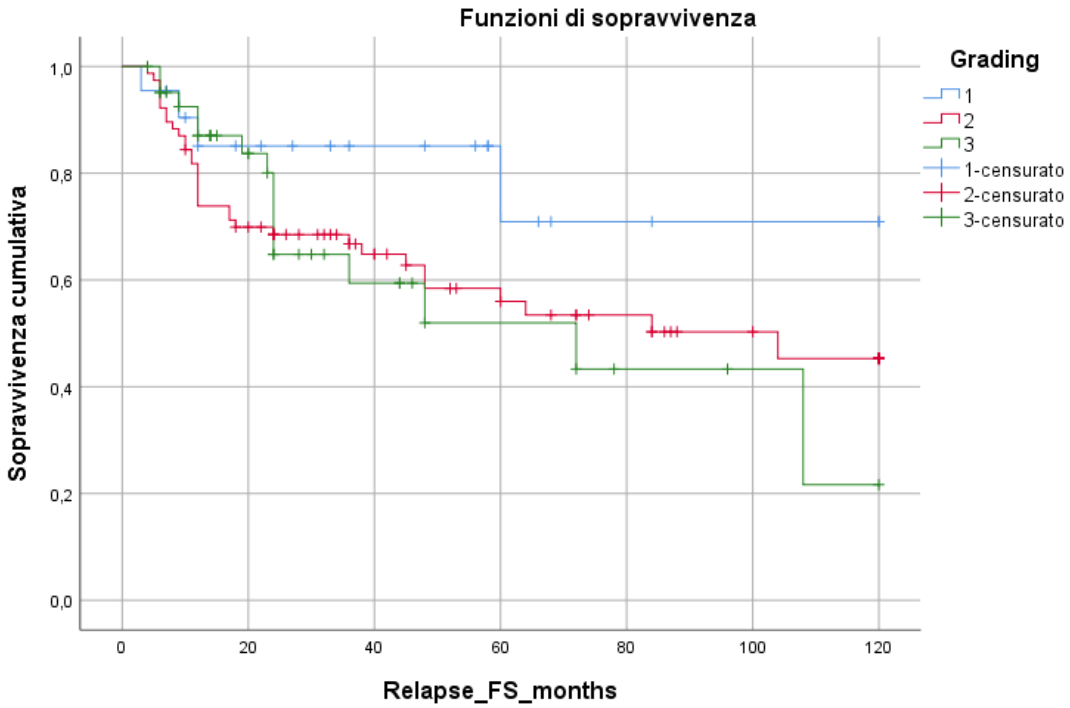


Figura 19. Analisi di Kaplan-Meier su tassi di formazione di recidive prendendo in considerazione il grading tradizionale.

Medie e mediane per tempo libero da recidive								
Grading tradizionale	**Media**				**Mediana**			
	Stima	Errore standard	I.C. del 95%		Stima	Errore standard	I.C. del 95%	
			lim. inf.	lim. sup.			lim. inf.	lim. sup.
1	60,0	0	60,0	60,0	60,0	-	-	-
2	81,1	6,3	68,7	93,6	-	-	-	-
3	67,1	7,3	52,9	81,3	72,0	25,5	21,9	122,1
Globale	75,6	4,7	66,5	84,8	104,0	23,8	57,3	150,7

Tabella 14. Valori di medie e mediane del tempo libero da recidive in base al sistema di mG.

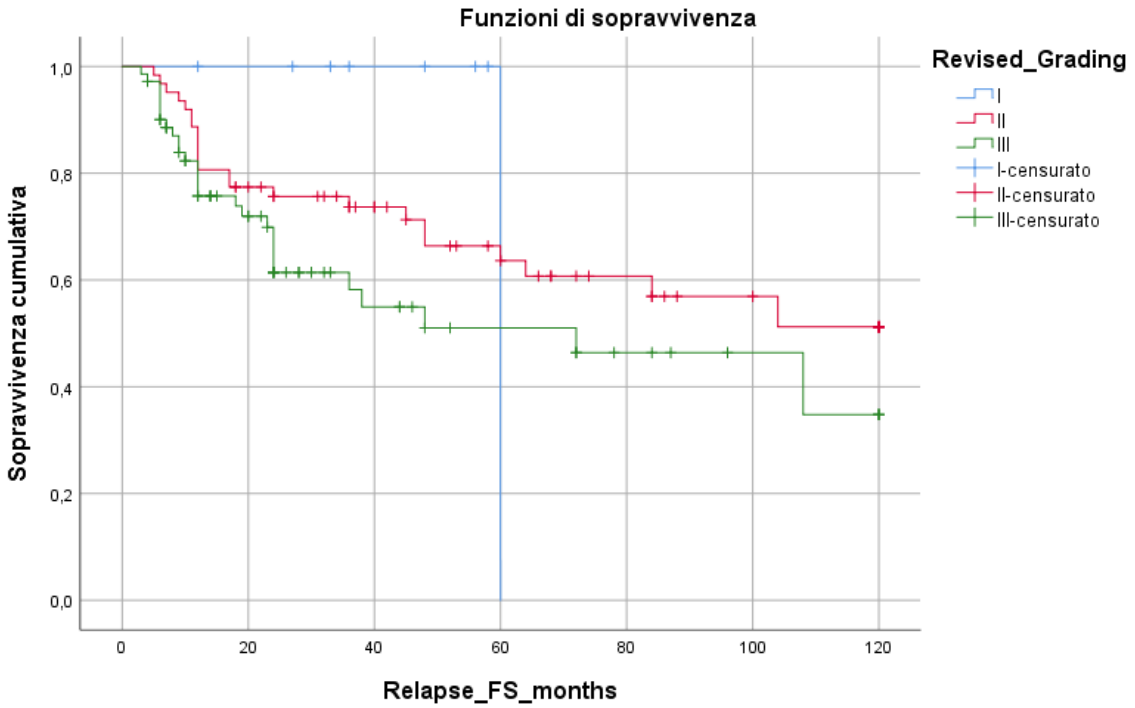


Figura 20. Analisi di Kaplan-Meier su tassi di formazione di recidive prendendo in considerazione il sistema mG.

4.3 ANALISI MULTIVARIATA DI SOPRAVVIVENZA E RECIDIVA

Sono state eseguite analisi multivariate per verificare se il grading modificato possa influire sulla sopravvivenza e la recidiva in modo maggiore rispetto al grading tradizionale. L'analisi multivarita di Cox prende in considerazione le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di chiarire il significato prognostico dei due sistemi di grading considerati.

La Tabella 15 evidenzia come l'età, il sesso e lo stadio siano significativi rispetto al rischio di morte dato che $p<0.05$. Al contrario del grading tradizionale, il sistema mG è risultato un fattore prognostico indipendente negativo ($p = 0.008$).

Variabili nell'equazione				
Variabile	Valore P	Hazard Ratio	IC 95,0%	
			Lower	Upper
Stadio	0,006	1,395	1,098	1,771
Sesso	0,042	0,551	0,310	0,979
Età	0,013	1,024	1,005	1,043
Grading tradizionale	0,549	0,680	0,193	2,400
Grading modificato	0,008	0,470	0,269	0,819

Tabella 15: valori risultanti dall'analisi multivariata che evidenziano il ruolo prognostico indipendente negativo del grading modificato.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Le modalità di trattamento nei pazienti affetti da OTSCC si basano sulla valutazione preliminare dello stadio tumorale mediante l'impiego della stadiazione TNM. Sebbene sia riconosciuto come uno strumento in grado di fornire delle indicazioni standardizzate e ripetibili, questo sistema risulta ancora non del tutto soddisfacente nel predire la prognosi dei pazienti affetti da OTSCC, in particolare nei tumori in stadio iniziale (T1/2N0). La diagnosi di OTSCC in stadio iniziale non è sempre legata ad una buona prognosi, dal momento che circa il 20-40% dei pazienti presentano metastasi cervicali, complicanza associata ad un maggior tasso di recidive e a una minore sopravvivenza [51]. L'obiettivo dell'attuale ricerca in campo prognostico è quella di caratterizzare con precisione quel sottoinsieme di pazienti a maggior rischio di outcome avverso che potranno beneficiare della terapia più adatta al fine di risolvere definitivamente la malattia, sia essa chirurgica che radio-chemioterapica. La chirurgia preventiva in pazienti di cui non è possibile inquadrare con accuratezza il rischio di metastasi e recidiva è, infatti, molto controversa e il rischio di determinare un *overtreatment* è alto.

Il presente studio è incentrato suli tumori della lingua, sito di maggior incidenza del OSCC, a causa delle sue caratteristiche strutturali, che includono un alto contenuto di fasci muscolari e una fitta rete linfatica che si pensa influenzino le capacità di diffusione del tumore stesso.

La letteratura corrente include numerosi studi riguardanti parametri istomorfologici, che possano essere utilizzati per ottenere un'accurata prognosi di pazienti affetti da OTSCC, e più in generale OSCC, e di conseguenza classificare i pazienti in base al rischio di metastasi e recidiva. Requisito fondamentale di tali parametri è la semplicità, riproducibilità e accuratezza, al fine di poterli integrare nei report patologici di routine.

Il budding tumorale (TB) esprime dal punto di vista strettamente morfologico due proprietà cardine di malignità: la perdita di coesione cellulare e l'invasività. Il TB si definisce come una singola cellula o un piccolo cluster di cellule inferiore a 5 lungo il fronte d'invasione tumorale, che rappresentano una sottopopolazione di cellule cancerose indifferenziate dal comportamento aggressivo. Introdotto per la prima volta nel carcinoma del colon-retto e, ad oggi, considerato un importante indice di valutazione della prognosi non solo del carcinoma del colon-retto, ma anche di numerosi altri tumori solidi, incluso il carcinoma del cavo orale [51].

La classificazione del numero di *bud* riscontrati da studio di Xie et al. (2015) suddivide i pazienti in maniera diversa da quanto proposto nel nostro studio, *low intensity* (<5 bud) e *high intensity* (≥5 bud). L'analisi istochimica comprende principalmente HE, integrata con immunoistochimica nei casi dubbi. La correlazione tra il TB e gli altri parametri clinicopatologici non concorda con quanto dimostrato dal nostro studio: il TB non ha rilevanza statistica se correlato all'età, stadiazione, grading tradizionale. Tuttavia, l'intensità di TB è fortemente correlata a metastasi linfonodale e recidiva. Analisi univariate mostrano come le metastasi linfonodali (P=0.007), la recidiva (P=0.000) e il TB (P=0.002) siano predittori statisticamente significativi della prognosi. Le analisi multivariate utilizzano questi fattori patologici come covariate: TB e recidiva sono fattori prognostici indipendenti, con P=0.000 (HR 5.582) e P=0.026 (HR 5.585) [51]. L'*high intensity* TB si correla con una ridotta OS, come riportato in figura 21, evidenziando una differenza statisticamente significative (P<0.001).

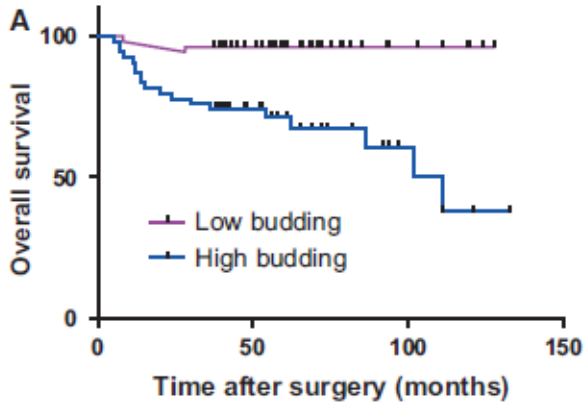


Figura 21. OS post-trattamento della coorte analizzata (da Xie et al., 2015).

L’alta intensità di TB è correlata a una maggior frequenza di metastasi linfonodali cervicali, recidiva locale, diminuzione dell’OS negli stadi clinici iniziali. Il TB è un fattore prognostico indipendente dei pazienti con OTSCC cT1/2N0 [51].

Sempre secondo Xie et al. (2019) il TB subisce un notevole miglioramento quando valutato secondo le raccomandazioni dell’International Tumor Budding Consensus Conference, con una stratificazione in tre categorie: Bd1 (0-4 bud), Bd2 (5-9 bud), Bd3 (≥10 bud) e differenziazione secondo il grading tradizionale. La correlazione del TB con altri parametri clinicopatologici non evidenzia differenze tra TB ed età, sesso, Stadio T, al contrario da quanto emerso dal nostro studio, in cui il grading modificato si correla con un aumento dello stadio patologico. La conta del TB è, tuttavia, associata in maniera significativa a metastasi linfonodale ($P<0.001$), grading tradizionale ($P=0.048$), recidiva ($P=0.003$).

Valutando il valore prognostico del TB, secondo la classificazione di Xie et al., è possibile dimostrare come l’OS delle tre categorie abbia risultati concordi con i nostri dati, seppur con una stratificazione diversa da quella da noi proposta, con diminuzione della sopravvivenza dei soggetti che presentano maggiore intensità di TB (Bd 2 e 3) rispetto a quelli di minor intensità (Bd1) [38].

L’Analisi univariata mostra come lo scoring del Bd, in particolare il valore del Bd 2 e 3 siano utili predittori di prognosi nei OTSCC. In pazienti in stadio iniziale, il TB è un fattore prognostico utile ($P=0.006$), assieme a metastasi linfonodali e profondità di invasione. Analisi multivariate individuano il TB e la recidiva come fattori prognostici significativi indipendenti con $P=0.008$. Da ciò emerge che i pazienti con Bd2-3 in tumori in stadio iniziale hanno prognosi peggiore rispetto ai Bd1, dunque hanno bisogno di un intervento più radicale [38].

Lo studio del TB può altresì dare promettenti risultati quando associato a parametri differenti dal grading. Hori et al. (2017), Almangush et al. (2018) correlano il TB con la profondità di invasione tumorale. Il TB rappresenta un parametro numerico, facile e riproducible, che può essere correlato alla profondità di invasione (definita come predittore di metastasi linfonodali occulte secondo le linee guida del National Comprehensive Cancer Network) [44, 52].

Il modello BD proposto da Almangush et al. (2018) stratifica i casi in tre gruppi, osservabili in Tabella 8, una stratificazione, diversa con quella proposta nel nostro studio, applicata in due tipi di campioni, prelevati prima e dopo il trattamento chirurgico. La correlazione del modello BD e lo stadio ha un'associazione significativa (P=0.001), suggerendo che il BD abbia valore prognostico superiore rispetto ad altri parametri (come la dimensione del tumore e il sistema di grading tradizionale).

Secondo Hori et al. (2017) la profondità di invasione è l'unico fattore di rischio istopatologico che possa guidare il clinico in fase di *decision making* della terapia, anche se stratificare il rischio del paziente è ancora difficile da identificare in maniera precisa. Gli studiosi ipotizzano che esistano caratteristiche istopatologiche microscopicamente osservabili che possano essere correlate a prognosi infausta in pazienti affetti da OTSCC, tra cui il TB.

Il TB è stato dunque valutato con una classificazione a due categorie, basso grado (< 5 buds) e alto grado (≥ 5 buds), a cui è stata integrata la profondità di invasione, calcolata dal punto più superficiale del tumore, fino al punto di più profondo di invasione [52]. Dallo studio emerge come i pazienti con una profondità di invasione (≥ 3mm) presentino maggior incidenza di recidiva. L'esecuzione di un log-rank test identifica l'alto grado di TB come un fattore di rischio di recidiva (P >0.001) e il modello proporzionale di Cox, concorde con il nostro studio, identifica l'alto grado di TB come un fattore di rischio indipendente. Dal momento che lo studio si incentra sulla correlazione del TB con la profondità di invasione, una profondità ≥ 3 mm combinata ad un alto grado di TB presenta un elevato grado di sensibilità e specificità, con un valore prognostico negativo del 97%, suggerendo come questa correlazione presenti un elevato valore diagnostico. Lo studio non fa alcun riferimento all'analisi del grado di TB e il grading, dal momento che il numero di carcinomi scarsamente differenziati non è sufficientemente alto da poter avere una buona riproducibilità. Ciò non incontra lo scopo del nostro studio, in cui il grading e il grading modificato rappresentano il fulcro della valutazione del rischio del paziente [52].

Lo studio cardine di Elseragy et al. nasce dall'esigenza di incorporare il TB nel grading e permette dunque una stratificazione sicuramente più fedele del paziente, ottenendo così l'*outcome* più probabile in termini di sopravvivenza e recidiva. Grazie a questo innovativo metodo di classificazione è stato possibile up-stadiare pazienti con un grado istologico tradizionale inferiore a un grado modificato maggiore, con un guadagno importante in termini di precisione prognostica (Tabella 9).

Secondo i risultati riscontrati nelle nostre analisi univariate e multivariate, stimare la mortalità di un paziente secondo il grading tradizionale ha un valore prognostico sicuramente minore rispetto al grading modificato: individui classificati come grado III rivisitato hanno elevata mortalità relativa al cancro e possono essere dunque indirizzati certamente alla terapia chirurgica [48].

Infine, è opportuno considerare che lo studio del parametro TB da noi condotto basa le sue considerazioni sul Grading Modificato di Elseragy et al. che, seppur performante, non è l'unico proposto nell'ambito della ricerca. Infatti, la conta del numero di *bud* e la stratificazione dei pazienti è variegata, spesso a discrezione del gruppo di ricerca, anche se molti fanno fede a quanto stabilito nell' ITBCC del 2016. Tuttavia, nonostante i numerosi *scoring methods* proposti, Xie et al. (2019) affermano che il TB sia un così robusto fattore prognostico da riuscire a produrre risultati simili fra loro [38].

Lo scoring del TB è tuttavia strettamente dipendente dalla colorazione istologica utilizzata: l'HE, colorazione molto diffusa e raccomandata dalla ITBCC, data la sua semplicità d'esecuzione e il buon rapporto costo-beneficio, è la colorazione da noi proposta. Numerosi studi suggeriscono l'integrazione di tale colorazione con l'immunoistochimica, utilizzata nel conteggio di casi dubbi o borderline, ma il suo utilizzo vanificherebbe il tentativo di semplificare e rendere fruibile il metodo da noi proposto.

Analogamente alle fonti prima citate, i risultati del nostro studio potrebbero subire modificazioni, poichè il campione di pazienti considerati rappresenta una piccola coorte: lo studio andrebbe dunque esteso ad un bacino più ampio di pazienti affetti da carcinoma, per poter consolidare la nostra tesi.

Dallo studio di Xie et al. (2015) ne abbiamo un esempio calzante: il numero esiguo di pazienti considerati dai ricercatori (95) non ha permesso di poter correlare il parametro TB ai tumori scarsamente differenziati, in quanto troppo poco rappresentati. Tuttavia, nello studio condotto da Hori et al. (2017) i pochi pazienti di grado 3 tradizionale sembrano non aver pregiudicato differenze significative nella valutazione della recidiva dei pazienti di grado 1 e 2.

Interessante è invece la correlazione tra TB e profondità di invasione proposta da Almangush et al. (2018) e Hori et al. (2017): come suggerito dai ricercatori, il modello BD potrebbe trovare una promettente applicazione in grandi coorti multicentriche, con valore prognostico maggiore rispetto ad altri parametri. Il suo utilizzo andrebbe indagato in maniera più approfondita.

In conclusione, secondo la recente classificazione WHO "Il grading da solo non è ben correlato alla prognosi", ma incorporando il TB ad esso potrebbe aumentare il suo valore prognostico. Il grading modificato (*m*G) da noi proposto ha un valore prognostico promettente nella valutazione del carcinoma del cavo orale e, in maniera più specifica, per il tumore della lingua in stadio iniziale.

BIBLIOGRAFIA

1. S. Givony, 2020. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) an overview. *Journal of Medical Sciences*. 8(13), pp. 67-74.
2. R. Rajeev, R. Heera, M. Renu Chandran, 2018. Recent trends in the clinicopathological characteristics of Oral squamous cell carcinoma – an instituitional study. *International Journal Of Scientific Research*. 7(7), pp. 2277-8179.
3. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, 2018. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 68(6), pp.394-424.
4. P. J. Thomson, 2018. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention- proliferation, position, progression and prediction. *Oral Pathology & Medicine*. 47(9), pp.803-807.
5. J. H. Ng, N Gopalakrishna Iyer, Min-Han Tan, G. Edgren, 2017. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head & Neck*. 39(2).
6. N. Gupta, R. Gupta, A. K. Acharya, B. Patthi, V. Goud, S. Reddy, et al., 2016. Changing Trends in oral cancer - a global scenario. *Nepal journal of Epidemiology*. 6(4), pp.613-619.
7. A. J. Kimple, C. M. Welch, J. P. Zevallos, S. N. Patel, 2014. Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma--An Overview. *Oral Health and Dental Management*. 13(3), pp. 877-882.
8. M. Kumar, R. Nanavati, T. G. Modi, C. Dobariya, 2016. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 12(2), pp. 248-463.
9. AIOM. I numeri del cancro in Italia. Intermedia Editore. 2019. (https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/09/2019_Numeri_Cancro-operatori-web.pdf). PDF. 14 settembre 2020.
10. J.A. Regezi, J.J. Sciubba, R.C.K. Jordan, 2008. Patologia Orale, Correlazioni clinico patologiche, Roma: Antonio Delfino Editore. Capitolo 14.
11. R. Anand, C. Dhingra, S. Prasad, I. Menon, 2014. Betel nut chewing and its deleterious effects on oral cavity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 10(3), pp.499-505.
12. N. R. Chourasia, R. M. Borle, A. Vastani, 2015. Concomitant Association of Oral Submucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma and Incidence of Malignant Transformation of Oral Submucous Fibrosis in a Population of Central India: *A Retrospective Study. Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*. 14(4), pp. 902-906.
13. SIPMO. Il Carcinoma Orale – Manuale di Riferimento. Foggia: Grilli Editore. (https://www.sipmo.it/wp-content/uploads/2014/12/Carcinoma-orale-Manuale-di-riferimento.pdf). PDF. 14 settembre 2020.
14. S. M. Kim, 2016. Human papilloma virus in oral cancer. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeon*. 42(6), pp.327-336.
15. T. Sritippho, P. Chotjumlong, A. Iamaroon, 2015. Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(15), pp. 6193-6200.
16. M. Carozzo, K. Scally, 2014. Oral manifestation of Hepatitis C infection. *World Journal of Gastroenterology*. 20(24), pp.7534-7543.
17. J.T. Guidry, C.E. Birdwell, R.S. Scott, 2017. Epstein–Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Diseases*. 24(4), pp. 497-508
18. A.Muthukrishnan, L. B. Kumar, 2017. Actinic cheilosis: early intervention prevents malignant transformation. *BMJ Case Report*.
19. M. P. Copper, A. Jovanovic, J. J. P. Nauta; B. J. M. Braakhuis, N. de Vries, Isaac van der Waal, et al., 1995. Role of Genetic Factors in the Etiology of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 121(2), pp.157-160

20. E. Piemonte, J. Lazos, P. Belardinelli, D. Secchi, M. Brunotto, H. Lanfranchi-Tizeira, 2018. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. *Medicina Oral, Patologìa Oral y Cirurgia Bucal*. 23(2), pp.151-60.
21. D. Ganesh, P. Sreenivasan, J. Öhman, M. Wallström, P. H. Braz-Silva, D. Giglio, G. Kjeller et al., 2018. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. *Anticancer Research*. 38, pp. 3223-3229
22. J. Bagan, G. Sarrion, Y. Jimenez, 2010. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology*. 46(6), pp.414-417. 24
23. B. L. Schmidt, 2015. The Neurobiology of Cancer Pain. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 73(12 Suppl): S132–S135.
24. J. Noguti, C. Foot Gomes de Moura, G. Protasio Pacheco de Jesus, V. H. Pereira da Silva, T. Ayako Hossaka, C. Tijuko Fujiyama Oshima et al., 2012. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. *Cancer Genomics & Proteomics*. 9, pp 329-336.
25. A. Bugshan, I. Farooq, 2020. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis [version 1; peer review: 3 approved]. F100Research. 9:229 (https://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1). WEB. 14 settembre 2020.
26. N. Bolesina, F. L. Femopase, S. A. López de Blanc, R. A. Morelatto M. A. Olmos, 2012. Oral Squamous Cell Carcinoma Clinical Aspects. Oral Cancer. (https://www.intechopen.com/books/oral-cancer/oral-squamous-cell-carcinoma-clinical-aspects). PDF. 14 settembre 2020.
27. S. Preston-Martin, B. E. Henderson, M. C. Pike, 1982. Descriptive Epidemiology of Cancers of the Upper Respiratory Tract in Los Angeles. *Cancer*. 49(10), pp. 2201-2207.
28. C. Rivera, B. Venegas, 2014. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncology Letters*. 8, pp. 7-11.
29. A. M. Bunget, I. T. Dascălu, E. Coleș, T. Țîrcă, M. Stan, S. Găman et al, 2018. Histopathological Aspects in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Open Access Journal of Dental Sciences*. 3(3).
30. M. Mupparapu, R. M. Shanti, 2018. Evaluation and Staging of Oral Cancer. *Dental Clinics of North America*. 62(1), pp. 47-58
31. D. Chatterjee, V. Bansal, V. Malik, R. Bhagat, R. Singh Punia, U. Handa et al., 2019. Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated With Poor Survival in Early-Stage Tumors. *Ear, Nose & Throat Journal*. 98(7), pp. E112-E119.
32. A. Lugli, R. Kirsch, Y. Ajioka, F. Bosman, G. Cathomas, H. Dawson et al., 2017. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 30, pp. 1299-1311.
33. A. D. Kale, P. V. Angadi, 2019. Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*: JOMFP. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6948063/). WEB. 14 settembre 2020.
34. K. Hong, K. Oh, W. Shin, H. Yoon, J. Lee, S. Hong, 2018. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process. *Human Pathology*. 80, 123-129
35. C. Rivera, A. K. Oliveira, R. Alves Pereira Costa, T. De Rossi, A. Franco Paes Leme, 2017. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncology*. 72, pp. 38–47
36. C. Wang, H. Huang, Z. Huang, A. Wang, X. Chen, L. Huang, et al., 2011. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelialmesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 40(7), pp. 545-551.
37. Y. Zhu, H. Liu, N. Xie, X. Liu, H. Huang, C. Wang et al., 2018. Impact of tumor budding in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Head & Neck*. 41(2), 1-9.

38. N. Xie, P. Yu, H. Liu, X. Liu, J. Hou, X. Chen, et al., 2019. Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (2016) recommendations in oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 48, pp. 451-459.
39. http:// https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/
40. D. Chatterjee, V. Bansal, V. Malik, R. Bhagat, R. Singh Punia, U. Handa et al., 2019. Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated with Poor Survival in Early-Stage Tumors. *Ear, Nose & Throat Journal*. 98(7), pp. E112-E119.
41. L. Reggiani Bonetti, V. Barresi, S. Bettelli, F. Domati, C, Palmiere, 2016. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagnostic Pathology*. 11: 31.
42. N. Juel Pedersen1, D. Hebbelstrup Jensen, G. Lelkaitis, K. Kiss, B. Charabi, L. Specht, C. et al., 2017. Construction of a pathological risk model of occult lymph node metastases for prognostication by semi-automated image analysis of tumor budding in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 8(11), pp. 18227-18237
43. P. V. Angadi, P. V. Patil, K. Hallikeri, M. D. Mallapur, S. Hallikerimath, A. D. Kale, 2015. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Surgical Pathology*. 23(2), pp. 102–110
44. A. Almangush, I. Leivo, M. Siponen, E. Sundquist, R. Mroueh, A. A. Mäkitie et al., 2018. Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies. *Virchows Arch*, 472, pp.231,236.
45. S. Thies, L. Guldener, J. Slotta-Huspenina, I. Zlobec, V. H. Koelzer, A. Lugli, et al., 2016. Impact of peritumoral and intratumoral budding in esophageal adenocarcinomas. *Human Pathology*. 52, pp. 1-8.
46. A. Almangush, M. Pirinen, I. Heikkinen, A. A. Mäkitie, T. Salo, I. Leivo, 2018. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 118, pp. 577-586
47. L.P. Kowalski, A. Sanabria, 2007. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Oncology*. 27, pp. 113-117
48. A.Elseragy, T. Salo, R. D. Coletta, L. P. Kowalski, C. Haglund, MD, P. Nieminen et al., 2019. *The American Journal of Surgical Pathology*. 43(5), pp. 703-709.
49. Amin, M.B., S.B. Edge, and American Joint Committee on Cancer, AJCC cancer staging manual. 8th ed. ed. 2017, Switzerland: Springer. xvii, 1024 pages.
50. El-Naggar, A., et al., eds. WHO classification of head and neck tumours. 4 ed. World Health Organization classification of tumours. 2017, International Agency for Research on Cancer: Lyon. 347 pages.
51. N. Xie, C. Wang, X. Liu, R. Li, J. Hou, X. Chen et al.,2015. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early stage tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine,* 44, pp. 266-272.
52. Y. Hori, A. Kubota, T. Yokose, M. Furukawa, T. Matsushita, S. Mitsunaga et al., 2017 Predictive Significance of Tumor Depth and Budding for Late Lymph Node Metastases in Patients with Clinical N0 Early Oral Tongue Carcinoma. *Head and Neck Pathology*, 11, pp. (477-486)