



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria
Presidente: Prof. Maurizio Procaccini

**RUOLO PROGNOSTICO DELL'INVASIONE
PERINEURALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA
CARCINOMA SQUAMOCELLULARE
DELLA LINGUA**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Andrea Santarelli

Tesi di Laurea di:

Iyed Sghaier

Correlatore:
Dott. Marco Mascitti

A.A. 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1: IL CARCINOMA ORALE.....	1
<i>1.1 INTRODUZIONE.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 EPIDEMIOLOGIA.....</i>	<i>1</i>
<i>1.3 FATTORI DI RISCHIO.....</i>	<i>8</i>
<i>1.4 CARATTERISTICHE CLINICHE.....</i>	<i>15</i>
<i>1.5 SEDI ANATOMICHE.....</i>	<i>20</i>
<i>1.6 ISTOPATOLOGIA.....</i>	<i>25</i>
<i>1.7 CLASSIFICAZIONE TNM, STADIAZIONE, GRADING.....</i>	<i>28</i>
 CAPITOLO 2: INFILTRAZIONE PERINEURALE.....	 32
<i>2.1 INTRODUZIONE</i>	<i>32</i>
<i>2.2 NERVO E NICCHIA PERINEURALE.....</i>	<i>33</i>
<i>2.3 DEFINIZIONE DI PNI.....</i>	<i>34</i>
<i>2.4 INCIDENZA DELLA PNI NEI CARCINOMI A C. SQUAMOSE.....</i>	<i>35</i>
<i>2.5 ESITO CLINICO.....</i>	<i>36</i>
<i>2.6 MARCATORI MOLECOLARI.....</i>	<i>37</i>
 CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO.....	 46
 CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI.....	 47
<i>4.1 SELEZIONE DEI CASI.....</i>	<i>47</i>

<i>4.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA.....</i>	<i>48</i>
CAPITOLO 5: RISULTATI.....	50
<i>5.1 DATI CLINICO-PATOLOGICI.....</i>	<i>50</i>
<i>5.2 ANALISI DI SOPRAVVIVENZA.....</i>	<i>51</i>
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	68

CAPITOLO 1: IL CARCINOMA ORALE

1.1 INTRODUZIONE

Il carcinoma a cellule squamose è la tipologia più comune di carcinoma orale, e rappresenta più del 95 % dei casi [1]. Nel 2012 sono stati diagnosticati più di 300,000 nuovi casi di carcinoma orale e orofaringeo, con una sopravvivenza complessiva che si attesta attorno al 50% [2]. Il carcinoma orale è presente soprattutto nei paesi in via di sviluppo [3], i quali condividono fattori di rischio comuni: consumo di tabacco e alcol, masticazione di betel, infezione da HPV e dieta povera.

La sede maggiormente colpita risulta essere la lingua, seguita dal pavimento orale e dal labbro. Altre sedi sono rappresentate dal trigono retromolare, dalla mucosa buccale, dal palato duro, dalla gengiva superiore e dalla gengiva inferiore. Esistono variazioni nei tassi di prevalenza a seconda del sito, della regione e del sesso [4].

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Nel 2012 sono stati diagnosticati 300.373 nuovi casi di carcinoma del cavo orale nel mondo. I tassi di incidenza, prevalenza e mortalità variano in base ai Paesi e alle regioni (Figure 1, 2 e 3) [5].

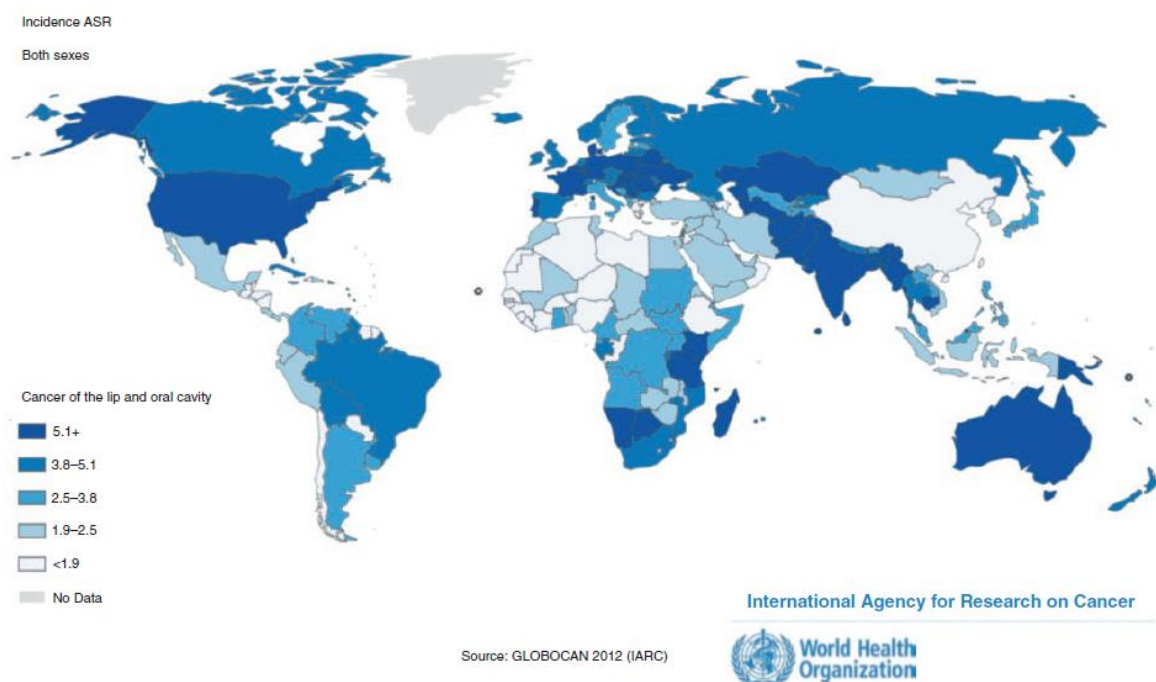


Figura 1. Mappa globale dei tassi di incidenza standardizzati per età del carcinoma orale in entrambi i sessi e in tutte le età, dati derivati da GLOBOCAN 2012.

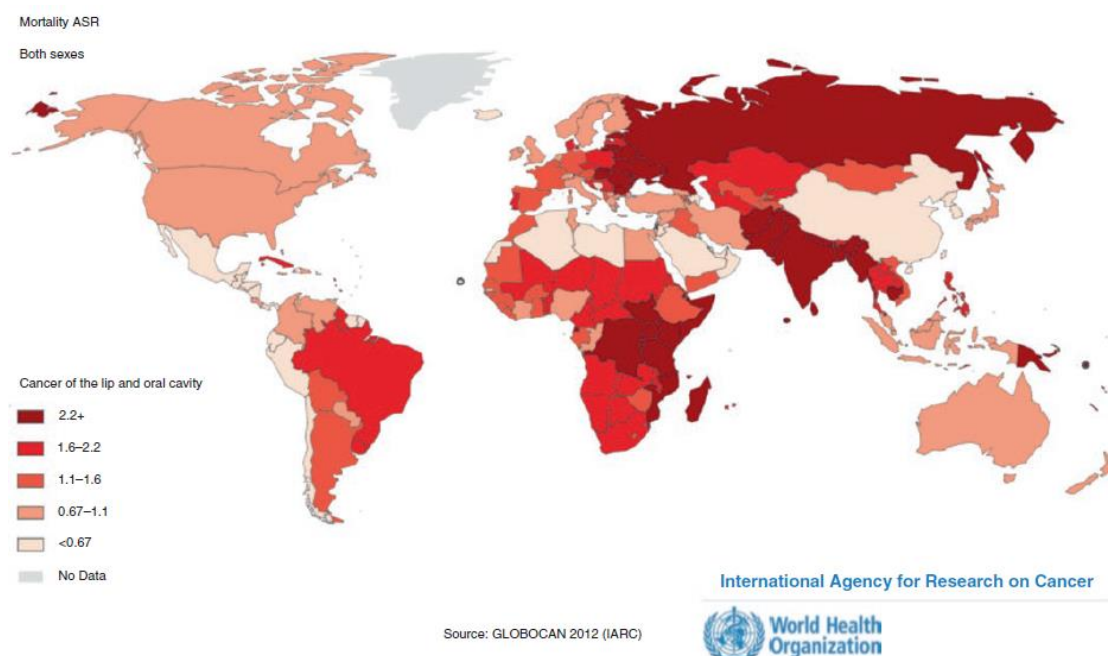


Figura 2. Mappa globale dei tassi di mortalità standardizzati per età del carcinoma orale in entrambi i sessi e in tutte le età, dati derivati da GLOBOCAN 2012.

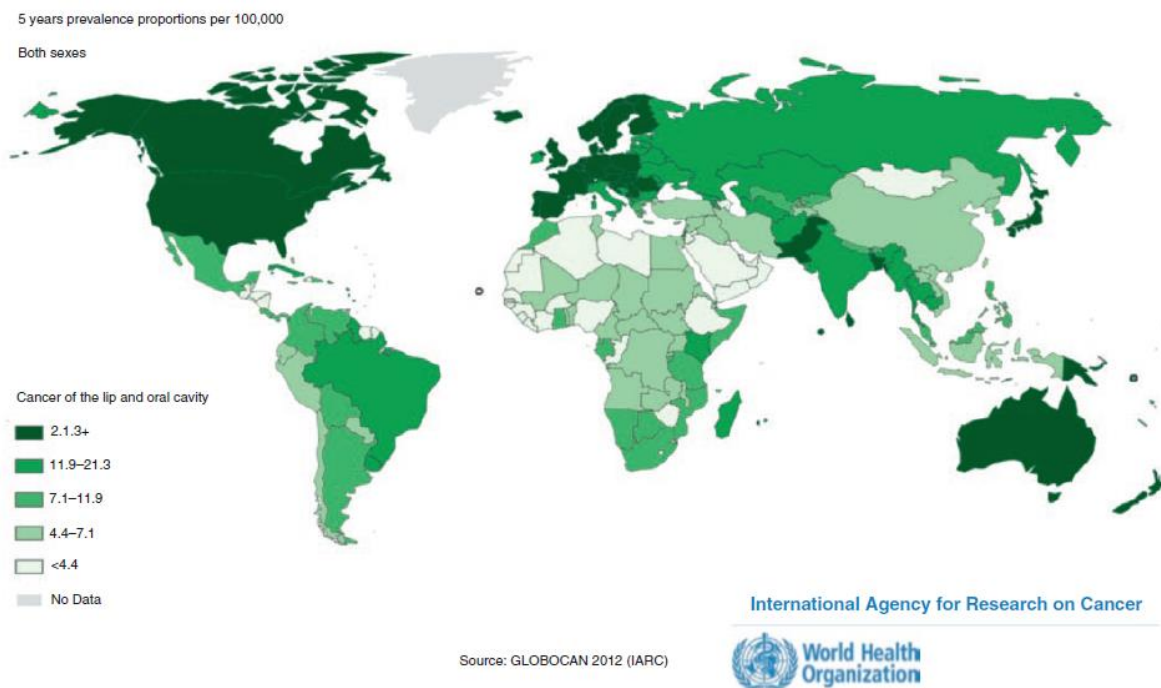


Figura 3. *Mappa globale dei tassi di prevalenza standardizzati per età del carcinoma orale in entrambi i sessi e in tutte le età, dati derivati da GLOBOCAN 2012.*

La regione del Sud-est asiatico presenta il tasso di incidenza più alto, seguita da Europa, regione del Mediterraneo orientale, America, Africa e regione del Pacifico occidentale. Il tasso di mortalità mondiale stimato nel 2012 è di 2,7 per 100.000 [5]. I tassi di incidenza e mortalità più alti sono riscontrati in India (Figura 4).

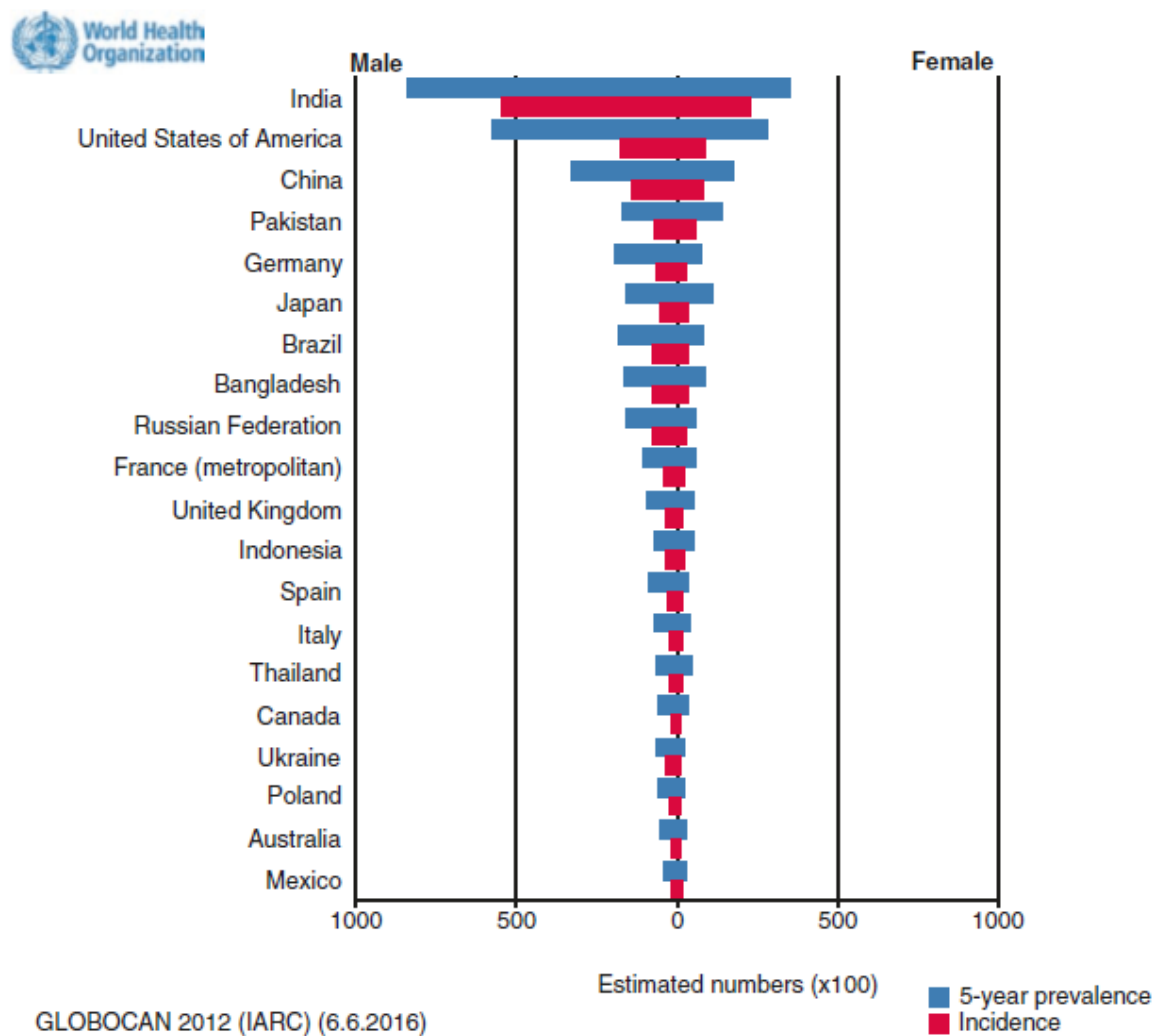


Figura 4. Incidenza e mortalità del carcinoma della testa e del collo stimati nel 2012 nei 20 maggiori paesi del mondo.

Il tasso di incidenza mondiale risulta essere di 15,6 per 100.000 negli uomini, e 6,1 per 100.000 nelle donne (Tabella 1, Tabella 2) [6, 7].

Population	Numbers	Crude rate	ASR (W) ^a	Cumulative risk
World	300,373	4.3	4.0	0.45
More developed regions	100,823	8.1	4.7	0.54
Less developed regions	199,550	3.4	3.7	0.42
Very high human development	92,338	8.0	4.8	0.54
High human development	45,734	4.4	3.8	0.45
Medium human development	121,240	3.4	3.3	0.38
Low human development	40,954	3.1	5.2	0.59
WHO African region (AFRO)	13,484	1.5	2.7	0.30
WHO Americas region (PAHO)	49,200	5.2	4.1	0.48
WHO East Mediterranean region (EMRO)	20,681	3.3	4.6	0.52
WHO European region (EURO)	65,933	7.3	4.6	0.53
WHO Southeast Asian region (SEARO)	103,464	5.6	6.4	0.73
WHO Western Pacific region (WPRO)	47,524	2.6	2.0	0.22
Middle East and Northern Africa (MENA)	7855	1.8	2.2	0.25

^aASR (W): Age-standardized rate to the world population

Tabella 1. Incidenza stimata del carcinoma orale e orofaringeo in tutto il mondo (tutte le età, entrambi i sessi), dati derivati da GLOBOCAN 2012.

Population	Numbers	Crude rate	ASR (W) ^a	Cumulative risk
World	145,353	2.1	1.9	0.22
More developed regions	33,313	2.7	1.4	0.16
Less developed regions	112,040	1.9	2.1	0.24
Very high human development	26,970	2.3	1.2	0.14
High human development	19,615	1.9	1.6	0.19
Medium human development	73,503	2.1	2.0	0.23
Low human development	25,238	1.9	3.3	0.39
WHO African region (AFRO)	8530	1.0	1.8	0.20
WHO Americas region (PAHO)	12,803	1.3	1.0	0.12
WHO East Mediterranean region (EMRO)	10,997	1.8	2.5	0.30
WHO European region (EURO)	25,202	2.8	1.7	0.19
WHO Southeast Asian region (SEARO)	65,734	3.5	4.1	0.48
WHO Western Pacific region (WPRO)	22,068	1.2	0.9	0.09
IARC membership (24 countries)	81,929	3.1	2.6	0.29
Middle East and Northern Africa (MENA)	3154	0.7	0.9	0.10

^aASR (W): Age-standardized rate to the world population

Tabella 2. Mortalità stimata del carcinoma orale e orofaringeo in tutto il mondo (tutte le età, entrambi i sessi), dati derivati da GLOBOCAN 2012.

Per quanto riguarda l'età di insorgenza, la maggior parte dei casi di carcinoma orale si manifesta tra i 50 e i 75 anni di età (Tabella 3) [1].

Cancer	Total	0–14	15–39	40–44	45–49	50–54	55–59	60–64	65–69	70–74	75+	ASR (W)
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	14,067,894	8.8	37.5	138.8	220.9	338.2	489.1	683.9	895.8	1114.4	1544.0	182.0
Lip, oral cavity	300,373	0.1	0.9	3.7	6.1	9.5	12.7	15.7	18.3	20.3	23.4	4.0

Tabella 3. Incidenza ASR stimata del carcinoma orale per gruppi di età rispetto a tutti i tumori escluso il cancro della pelle non melanoma, dati derivati da Globocan 2012 per tutti i sessi.

Negli ultimi anni si riscontrano sempre più casi di carcinoma orale in una popolazione più giovane [8], e il sesso maschile risulta essere nel complesso quello maggiormente colpito [9, 10-16].

I fattori di rischio che influenzano maggiormente le differenze riscontrabili tra le varie regioni sono l'uso di tabacco e di alcol, e le infezioni da HPV [4, 18, 19-23]. L'HPV riveste un ruolo fondamentale nell'insorgenza del carcinoma orofaringeo [24]. La riduzione dell'abitudine tabagica, iniziata gradualmente a partire dagli anni '70, ha determinato la diminuzione del numero di carcinomi associati all'uso di tabacco [17].

L'incidenza del carcinoma orale tra le donne è aumentata in maniera significativa tra il 1983 e il 2002 in diversi Paesi europei tra cui anche l'Italia [19]. In particolare, sia in Francia che in Italia i tassi sono diminuiti per gli uomini ma aumentati per le donne.

Per quanto riguarda la sopravvivenza, i fattori prognostici principali sono il coinvolgimento linfonodale, le dimensioni del tumore e lo status socioeconomico del paziente [25, 18]. La sopravvivenza a 5 anni risulta inferiore al 50%, e questo dato è rimasto invariato negli ultimi 40 anni. La prognosi migliore si osserva nel carcinoma del labbro, con una sopravvivenza superiore al 90%. La prognosi è severamente influenzata dall'eventuale coinvolgimento linfonodale. Per un carcinoma precoce localizzato di stadio I si osserva una sopravvivenza superiore all'80%, dato che scende drasticamente sotto al 15% per un carcinoma avanzato di stadio IV [18]. In Europa l'attuale tasso di sopravvivenza si attesta al 50% [26]. Per quanto concerne i siti di insorgenza, è assodato che essi siano definiti dai fattori di rischio predominanti nelle singole regioni.

1.3 FATTORI DI RISCHIO

I principali fattori di rischio del carcinoma squamocellulare sono il fumo di tabacco e l'abuso di alcol: circa l'80% di queste neoplasie è dovuto proprio a queste abitudini [27, 28], e la loro eliminazione porterebbe, in Europa e negli USA, ad una riduzione del 60-80% dell'incidenza [29]. A conferma di questo, negli USA lo stato con l'incidenza più bassa di questa neoplasia è lo Utah, dove il 75% della popolazione non consuma alcol e tabacco per via della dottrina Mormone [30].

Altri fattori implicati nella cancerogenesi del carcinoma orale a cellule squamose sono: agenti infettivi, fattori nutrizionali e dietetici, scarsa igiene orale, traumatismi cronici, radiazioni ultraviolette, immunodepressione e fattori genetici.

Tabacco

L'associazione tra l'abitudine al fumo di tabacco e l'insorgenza del carcinoma orale a cellule squamose è ormai ampiamente dimostrata. Si stima che più dell'80% dei soggetti affetti da questa neoplasia sono o erano fumatori [31]. Nei fumatori, rispetto ai non fumatori, il rischio di sviluppare questo carcinoma è da 5 a 9 volte maggiore [29, 32-35]. Questo rischio è inoltre legato alla dose, risultando infatti raddoppiato nei fumatori di più di 20 sigarette al giorno rispetto a quelli che ne fumano meno di 20 al giorno [36]. Nei fortissimi fumatori (80 o più sigarette al giorno) il rischio è aumentato di ben 17 volte rispetto ai non fumatori [31]. Inoltre, i pazienti con questo tipo di carcinoma che continuano a fumare anche dopo la diagnosi e l'eventuale trattamento, hanno un rischio aumentato di 6 volte, rispetto a chi smette di fumare, di sviluppare ulteriori neoplasie primarie delle vie aereo-digestive superiori [37-40].

L'azione cancerogena del tabacco è dovuta alla presenza in esso di più di 300 prodotti della combustione con effetto mutageno [28]. Un probabile cofattore è rappresentato dall'irritazione termica diretta sulle mucose, come dimostrato dal fatto che il *reverse smoking* (abitudine di fumare le sigarette con l'estremità accesa posta all'interno della bocca), diffuso in alcune zone dell'India, del Sud America e anche della Sardegna, è associato ad un rischio ancora superiore di sviluppare questa neoplasia, soprattutto a livello del palato [41].

Altre abitudini legate al tabacco collegate all'insorgenza del carcinoma orale a cellule squamose sono: il tabacco masticato e il cosiddetto *snuff* (in cui si mantiene del tabacco triturato nel fornice labiale). In questo caso l'azione cancerogena è limitata all'area di mucosa in diretto contatto col tabacco [31]. Diversi studi indicano un rischio relativo notevolmente inferiore legato al consumo di tabacco senza combustione [42], tuttavia non è possibile trarre conclusioni certe a riguardo a causa dell'ampia eterogeneità per quanto riguarda varietà di tabacco e trattamenti utilizzati nelle varie aree geografiche [27, 43]. Inoltre in certe regioni c'è l'abitudine di masticare tabacco frammisto ad altre sostanze, che potrebbero aumentarne l'effetto cancerogeno. È il caso del *quid*, ottenuto avvolgendo una mistura di tabacco, noci di areca, lime e altre spezie all'interno di una foglia di betel. L'usanza di masticare *quid*, tipica in India e nel Sud-Est Asiatico, può determinare una *fibrosi sottomucosa orale*, ossia una degradazione della mucosa [44], che rappresenta una lesione precancerosa ad elevato tasso di trasformazione maligna [45]; il rischio per i consumatori abituali di *quid* di sviluppare carcinoma squamocellulare orale è circa dell'8% [30].

Alcuni studi suggeriscono una possibile correlazione del carcinoma orale a cellule squamose con la marijuana [46, 47] soprattutto nei giovani adulti [31], tuttavia studi successivi hanno smentito tali ipotesi [48, 49].

Alcol

Negli USA circa un soggetto su tre affetti da carcinoma orale a cellule squamose è un forte bevitore, mentre nella popolazione generale la quantità di forti bevitori ammonta al 10% [30]. L'alcol, nei confronti della cancerogenesi del carcinoma orale, svolge un ruolo sinergico al tabacco, con effetto moltiplicativo e non additivo del rischio. Nei soggetti "forti fumatori" (più di 20 sigarette al giorno) e "forti bevitori" (più di 5 dosi di bevande alcoliche al giorno) il rischio di sviluppare carcinoma squamocellulare è 13 volte superiore rispetto a soggetti solo "forte fumatore" o solo "forte bevitore" [50]. Nei soggetti sia "forti fumatori" che "forti bevitori" il rischio relativo di sviluppare questo tipo di carcinoma è da 50 a 100 volte superiore rispetto a soggetti né fumatori né bevitori [29, 35, 50].

Per quanto riguarda i soggetti solo bevitori e non fumatori, c'è un rischio relativo di sviluppare la neoplasia da 2 a 6 volte più alto nei forti bevitori rispetto ai modesti o non bevitori [51-53]. In generale il rischio di sviluppare carcinoma nei forti bevitori (più di 100 grammi di alcol al giorno) è fino a 30 volte superiore [34]. Similmente a quanto accade per il fumo di tabacco, il rischio relativo del consumo di alcol è dose-dipendente, ossia aumenta con l'aumentare della dose [52] e della durata di esposizione [53].

L'etanolo di per sé non ha attività mutagena [54]; se ne deduce quindi che l'azione cancerogena dell'alcol va attribuita a meccanismi indiretti. L'alcol infatti potrebbe fungere da solvente per altri componenti carcinogeni [55], aumentando cioè la permeabilità della

mucosa tramite un'azione irritativa e disidratante, e facilitando il passaggio di tali agenti [56]. Questi meccanismi confermano l'effetto oncogeno dato dalla sinergia di alcol e tabacco, ma non spiegano il motivo per cui le bevande alcoliche presentano un'azione cancerogena (dimostrata da evidenze epidemiologiche) anche in maniera indipendente. Questo effetto oncogeno indipendente potrebbe quindi essere dovuto a un metabolita primario dell'etanolo: l'*acetaldeide* [54, 57]. Inoltre, contaminanti e additivi presenti nell'alcol (idrocarburi policiclici aromatici in alcuni liquori e nitrosamine in alcune qualità di birra) potrebbero aumentarne il potere oncogeno [54]. Ulteriori cofattori potrebbero essere rappresentati da deficit nutrizionali e funzionali epatici dovuti all'abuso di alcol [58]. Per quanto riguarda il rischio attribuibile alle diverse bevande alcoliche, è lecito supporre che ogni tipo di bevanda contribuisca all'insorgenza di carcinoma orale squamocellulare in maniera proporzionale alla quantità di etanolo in essa contenuto.

Agenti infettivi

Gli agenti infettivi maggiormente studiati in merito alla loro implicazione nei processi di cancerizzazione della mucosa orale sono la *Candida* spp, l'HPV, l'EBV e l'HCV.

La *Candida* comprendente un alto numero di specie di miceti, che nel cavo orale di un soggetto sano sono molto spesso presenti come commensali [59]. Tuttavia, in seguito all'estrinsecazione di alcune caratteristiche patogene del micete, in concomitanza con numerosi fattori predisponenti locali e sistemici, le specie di *Candida* possono portare da un'infezione che prende il nome di *candidosi*.

L'associazione tra *candidosi* e rischio di trasformazione maligna di disordini potenzialmente maligni (soprattutto leucoplachie non omogenee e/o lesioni displasiche) rimane oggi una

questione ampiamente dibattuta. Tra le forme maggiormente indagate, la *candidosi cronica iperplastica* (o *leucoplachia candidosica*) è la principale [60].

Il meccanismo di trasformazione carcinomatosa maggiormente investigato risulta essere la capacità di queste specie di produrre sostanze potenzialmente cancerogene, come le nitrosamine endogene, a partire dai nitriti presenti nel cavo orale e soprattutto nella saliva [61, 62]. Tuttavia non è facile determinare se il micete sia il diretto responsabile della lesione, o se rappresenti solo un colonizzatore secondario. Se si considera anche la forte associazione tra questa forma di candidosi orale e altri fattori eziologici (primo fra tutti il fumo) [63], chiaramente risulta difficile stabilire con esattezza un indice di trasformazione maligna.

Per quanto riguarda i virus, il ruolo chiave di HPV nella carcinogenesi della mucosa genitale [64, 65-67], oltre alla presenza di DNA virale in lesioni orali maligne e/o potenzialmente tali, prima fra tutti la Leucoplachia Verrucosa Proliferativa (LPV), hanno portato all'ipotesi che esso potesse avere una correlazione eziologica anche nell'insorgenza del carcinoma orale squamocellulare [68]. Tuttavia negli anni questo assunto è stato messo in discussione da numerosi studi, il primo dei quali nel 1997 riscontra una prevalenza del virus nelle lesioni investigate pari allo 0% [69]. Studi successivi mostrano come non ci sia una discrepanza significativa tra la prevalenza di HPV-DNA nelle leucoplachie e nelle LVP [70, 71]. A tutt'oggi la comunità scientifica esclude una relazione eziologica diretta tra HPV e LPV, e anzi sostiene che il rischio oncogeno dell'infezione da HPV sia esteso a tutte le lesioni maligne e potenzialmente tali. La maggior parte degli autori è concorde nell'ipotizzare la sinergia con altri fattori di rischio (fumo, alcol, predisposizione genetica) per giungere all'espressione del fenotipo maligno [72, 73]. In conclusione possiamo dire che non è possibile essere certi del ruolo causale di HPV nei processi di carcinogenesi orale. Anche per

quanto riguarda EBV non sembra ci sia un nesso eziologico diretto col carcinoma orale a cellule squamose [74, 75], e un discorso analogo deve essere fatto anche per HCV [76].

Fattori nutrizionali e dietetici

L'aumento del consumo di frutta e verdura determina una riduzione del rischio di insorgenza del carcinoma orale squamocellulare [77, 78], correlazione probabilmente dovuta all'elevato contenuto in questi alimenti di antiossidanti (vitamina C, vitamina E, carotenoidi) [79, 80]. Diete ipercaloriche e ricche di grassi e carni sono invece associate ad aumento del rischio [81, 82]. Un aumentato rischio è stato riscontrato in stati deficitari di ferro [31, 83] e vitamina A [84].

Igiene orale

Condizioni di igiene orale scarsa possano rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma orale a cellule squamose [36, 85-88]. Tuttavia la scarsa igiene orale è spesso associata ad altri fattori di rischio come fumo e abuso di bevande alcoliche, pertanto non è possibile valutare il ruolo svolto in maniera indipendente dall'igiene orale precaria [27]. Un'igiene orale inadeguata potrebbe determinare uno stato irritativo cronico delle mucose orali tale da favorire l'azione oncogena di altri carcinogeni, fungendo quindi da modificatore piuttosto che da iniziatore dei meccanismi di cancerogenesi [89].

Traumatismi orali cronici

I traumatismi orali cronici non sono un fattore di rischio certo per il carcinoma orale squamocellulare [84]. Similmente alla scarsa igiene orale, si può ipotizzare che questi

traumatismi inducano stati di irritazione cronica delle mucose tali da favorire l'azione di altri carcinogeni [84, 89].

Radiazioni ultraviolette

Analogamente a quanto avviene per le neoplasie cutanee, l'esposizione solare è un fattore di rischio certo per l'insorgenza di carcinomi squamocellulari del labbro inferiore [84].

Stati di immunodepressione

I deficit immunitari possono predisporre all'insorgenza di carcinoma orale squamocellulare [90-95], soprattutto in concomitanza degli altri fattori di rischio noti [30, 89].

Fattori genetici

La familiarità per il carcinoma orale a cellule squamose determina un rischio aumentato da 2 a 4 volte di sviluppare tale neoplasia [96-100], e un rischio aumentato da 4 a 8 volte di sviluppare carcinomi orali multipli [101, 102].

1.4 CARATTERISTICHE CLINICHE

Più del 90% dei carcinomi orali sono a cellule squamose, sono generalmente preceduti da disordini potenzialmente maligni (PMD), anche se non tutti i PMD si trasformano in carcinomi. Nel 2% dei casi il carcinoma orale a cellule squamose si presenta con foci multipli sincroni o metacroni [103].

Il carcinoma orale squamocellulare presenta una tendenza infiltrativa precoce e una diffusione maggiore per via linfatica piuttosto che ematogena. L'infiltrazione linfonodale è condizionata dalle caratteristiche del carcinoma, quali: sede, dimensioni, istotipo tumorale, differenziazione istologica, anatomia e rete linfatica dell'organo colpito, rapporti istopatologici con le strutture anatomiche vicine. La sede della neoplasia primitiva normalmente influisce sul sito di metastatizzazione linfonodale. Le metastasi a distanza sono rare e tardive, e la sede maggiormente colpita è il polmone [104, 105].

Le tappe fondamentali da seguire per fare una corretta diagnosi di carcinoma orale squamocellulare sono l'anamnesi, l'esame clinico e gli esami strumentali.

Anamnesi

In presenza di lesione, è importante concentrarsi su alcuni aspetti fondamentali: consumo di tabacco e bevande alcoliche, igiene orale scarsa, storia familiare o personale di neoplasie, età superiore ai quaranta anni. Ci sono inoltre alcune manifestazioni che devono farci sospettare una possibile trasformazione:

- una macchia colorata o una chiazza bianca squamosa persistente che aumentano improvvisamente di dimensioni;
- un'ulcera che tende a non guarire;

- sanguinamento gengivale;
- mobilità dentale improvvisa e progressiva in assenza di parodontite;
- una ferita da estrazione dentaria che non guarisce;
- la perdita di ritenzione di una protesi;
- alterazioni della sensibilità;
- serramento o dolore nell'apertura della bocca;
- progressiva asimmetria facciale;
- difficoltà alla deglutizione e nel linguaggio.

Il dolore non è correlato alle dimensioni della neoplasia e normalmente appare ben localizzato e in relazione alla funzione [106].

Esame clinico

Esso si basa su ispezione e palpazione: l'ispezione visiva è fondamentale nella formulazione di un sospetto diagnostico, la palpazione permette invece di valutare consistenza, stato dei bordi e infiltrazione. Si possono distinguere tre forme cliniche di carcinoma orale [107, 108]:

- forma esofitica (Figura 5): si presenta come un'escrescenza rilevata sulla mucosa sana, pluri-mammellonata, di colore bianco o bianco-rosa, a cui generalmente corrispondono forme istologiche ben differenziate [106];

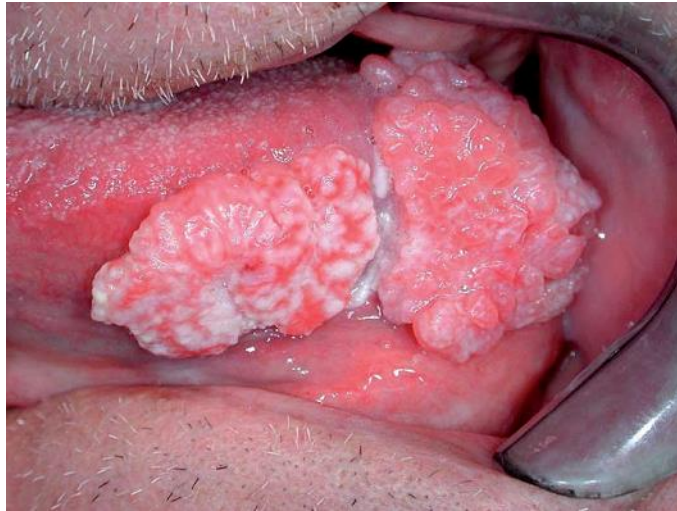


Figura 5. Forma esofitica.

- forma endofitica: la variante nodulare (Figura 6) si presenta come un nodulo duro sottostante alla mucosa apparentemente integra, mentre la variante infiltrante (Figura 7) è caratterizzata dall'indurimento della parte interessata associata a deficit funzionale quali difficoltà nei movimenti della lingua e serramento;



Figura 6. Forma endofitica, variante nodulare.



Figura 7. Forma endofitica, variante infiltrante.

- forma ulcerata (Figura 8): è la più comune, si presenta come un'ulcerazione irregolare a bordi induriti talvolta rilevati, duri alla palpazione. Il fondo è sanguinante, vegetante, talora ricoperto da materiale necrotico. La combinazione di questa forma con quella vegetante determina un aspetto misto, appunto ulcero-vegetante. La forma erosiva superficiale è caratterizzata invece da un'area rossa che può avere un aspetto vellutato oppure disomogeneo con aree bianche.



Figura 8. Forma ulcerata.

Diagnosi di diffusione linfatica

La diffusione linfatica è un evento quasi costante e talora molto precoce e, ad eccezione delle metastasi a distanza, rappresenta l'elemento prognostico negativo più importante [109]. La frequenza dell'interessamento linfonodale è correlata con la dimensione e la profondità d'invasione, lo spessore, la sede, il grado di differenziazione e la durata. La diffusione linfatica segue percorsi costanti in funzione delle dimensioni e soprattutto della sede, interessando innanzitutto i linfonodi sottomandibolari e sottomentali [110]. I tumori primitivi localizzati sulla linea mediana metastatizzano bilateralmente, mentre quelli situati in sede laterale normalmente metastatizzano in maniera monolaterale. La diffusione linfatica si valuta tramite palpazione e tecniche di imaging (ecografia, TC, RM).

Diagnosi di metastasi a distanza

La presenza di queste formazioni viene accertata mediante tecniche di imaging di varia natura a seconda del distretto corporeo. Esse vengono riscontrate raramente. La sede maggiormente interessata è il polmone, seguita da fegato e ossa [111].

1.5 SEDI ANATOMICHE

Carcinoma della lingua

La lingua è la sede maggiormente colpita (40-50 %) [112, 113], in particolare i 2/3 posteriori, la superficie ventrale e i margini. Questa neoplasia può inizialmente presentarsi come un'area leucoplasica o eritroplastica, una piccola ulcera, una massa esofitica papillomatosa o un nodulo intramurale sottomucoso.

Un sintomo d'esordio tipico di tumore linguale è rappresentato da una tumefazione linfonodale sottomandibolare. Spesso questo tumore si accresce notevolmente prima di dare una sintomatologia, la quale normalmente è correlata ad alterazioni della funzione dovute alle dimensioni della massa. Nelle forme avanzate invece, i sintomi più comuni sono disfagia, disfonia e sanguinamento [114]. Nel caso di estensione al pavimento orale si ha ostruzione salivare, immobilizzazione della regione sopraioidea con edema marcato, duro, e cute a buccia d'arancia. In caso di infiltrazione nervosa del nervo linguale si ha dolore diffuso o terebrante irradiato all'orecchio, mentre quando la diffusione interessa il nervo ipoglosso si potranno avere deficit motori, punta della lingua deviata e ostacolo nei movimenti.

Generalmente si ha una crescita verso i piani profondi dell'organo, dove la muscolatura determina spremitura delle cellule tumorali con effetto *squeezing* (presenza di focolai neoplastici distinti dalla 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.

Il carcinoma della lingua è caratterizzato da una notevole incidenza di linfadenopatie metastatiche [110].

Carcinoma del pavimento orale

Questa neoplasia è la seconda più frequente nei carcinomi orali con un'incidenza del 20% [112]. Nella zona anteriore del pavimento orale i sintomi spesso sono tardivi e aspecifici. Inizialmente si può manifestare come una piccola ulcera, e durante i movimenti linguali possono manifestarsi transitoriamente parestesie o dolore. L'invasione del dotto di Wharton può ostacolare il flusso salivare con conseguente tumefazione della ghiandola sottomandibolare corrispondente. Se l'ulcera si estende fino al nervo linguale si ha dolore urente, mentre l'infiltrazione dei piani profondi si manifesta con un irrigidimento dell'area e ostacolo alla mobilità linguale. Nel caso in cui il tumore superi la mandibola e invada il fornice si ha tumefazione del labbro inferiore.

La crescita può avvenire in direzione posteriore con interessamento del corpo della lingua; in profondità, infiltrando la ghiandola sottomandibolare, il dotto di Warthon, lungo il quale può diffondere fino alla ghiandola sottomandibolare; in direzione anteriore verso la mandibola. La diffusione linfatica è precoce [113].

Per quanto riguarda il pavimento orale laterale, questo rappresenta circa il 18% dei carcinomi orali. In questo caso la crescita è ridotta in superficie e si ha una precoce tendenza all'infiltrazione dei piani profondi. Normalmente si ha una erosione della mucosa, ulcera o lesione infiltrata a scodella. I sintomi d'esordio in genere sono tardivi e correlati all'estensione del tumore. 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 della regione labiale e mentoniera. L'infiltrazione profonda in direzione mediale è la più

frequente, con interessamento della muscolatura linguale estrinseca e diffusione lungo la muscolatura.

Carcinoma del labbro

Rappresenta circa il 20% dei tumori orali e interessa per il 95% il sesso maschile. Esso è generalmente meno aggressivo rispetto ad altre sedi di carcinoma orale, ed è caratterizzato da un decorso clinico più lungo. Il carcinoma del labbro si manifesta principalmente nelle zone maggiormente esposte alla luce solare come il labbro inferiore (89%) [115]. La forma più comune è quella esofitica, che talora si può presentare come un indurimento altamente cheratinizzato a superficie irregolare di colore bianco-marrone. Questa lesione tende ad accrescersi in superficie e, quando raggiunge un diametro superiore al centimetro, evolve sviluppando necrosi superficiale ed ulcerazione. Quando invece l'ulcerazione è precoce, si ha la tendenza all'infiltrazione, la quale tuttavia è rara.

Questa neoplasia presenta una progressione lenta, durante la quale si può presentare come un ispessimento epiteliale, sotto forma di ulcere o indurimenti su aree leucoplasiche. La manifestazione clinica iniziale più comune è rappresentata da ripetute croste siero ematiche, mentre l'ipoestesia del labbro è segno di infiltrazione nervosa.

Il carcinoma del labbro può diffondere alla cute e alla mandibola. Si può inoltre avere invasione perineurale del nervo mentoniero nel caso di forme alle commessure o forme avanzate al labbro inferiore. Per quanto riguarda la diffusione linfatica, l'incidenza di metastasi è correlata allo spessore tumorale, al pattern di crescita e all'invasione perineurale.

Carcinoma del trigono retromolare

Questa regione è interessata nel 15% dei carcinomi orali [112]. La sintomatologia iniziale generalmente è scarsa, mentre negli stadi avanzati i sintomi sono correlati alla diffusione: odinofagia, otalgia, dolori linguali, trisma ingravescente. L'infiltrazione del nervo mandibolare si manifesta con l'anestesia del labbro. Per quanto riguarda la diffusione, questa neoplasia può estendersi medialmente, inferiormente e superiormente.

Carcinoma della mucosa buccale

L'insorgenza di carcinomi in quest'area è poco frequente (8-10%) [113]. Le forme più comuni sono quelle vegetanti. Per quanto riguarda la sintomatologia si può avere una linfadenopatia sottomandibolare, una sensazione urente o un corpo estraneo, e dolore e trisma nelle forme avanzate. La diffusione locale avviene in tutte le direzioni.

Carcinoma del palato duro e della gengiva superiore

Palato duro e gengiva superiore sono sede dell'1-5% dei tumori del cavo orale. Questa neoplasia colpisce prevalentemente tra la VI e la VII decade, e interessa maggiormente il sesso maschile con un rapporto M/F di 5:1.

Questo carcinoma si presenta solitamente come ulcerazione dolente con bordo rilevato, fondo granuleggiante, talvolta sanguinante. Nel caso di neoplasie salivari, i sintomi consistono in una sensazione di ingombro, masticazione difficoltosa, mancata ritenzione della protesi, alterazioni del linguaggio.

La diffusione può riguardare i seni paranasali, la mucosa geniena oppure la tuberosità del mascellare e lo spazio pterigomascellare. Una particolare via di diffusione è quella nervosa

con estensione alla base cranica e al seno cavernoso [116]. La diffusione linfatica in genere si presenta tardivamente.

Carcinoma della gengiva inferiore

La gengiva inferiore è interessata nei tre quarti dei carcinomi gengivali, mentre la superiore solo in un quarto dei casi [112]. L'aspetto clinico e la sintomatologia iniziali possono spesso portare ad una diagnosi errata, mentre negli stadi avanzati la sintomatologia diventa più evidente ed è generalmente correlata con l'infiltrazione delle aree vicine. Questa neoplasia può avere una forma esofitica o ulcerativa. Poiché la gengiva è un'area mucosa piuttosto limitata, la maggior parte delle lesioni supera i limiti anatomici e diffonde a sedi vicine. La diffusione alle stazioni linfonodali avviene in maniera tardiva.

1.6 ISTOPATOLOGIA

Le caratteristiche principali del carcinoma a cellule squamose sono rappresentate appunto da una differenziazione squamosa e da una crescita invasiva. L'invasione si manifesta con la rottura della membrana basale e l'estensione nel tessuto sottostante, spesso accompagnata da reazione stromale. Ulteriori segni di malignità sono rappresentati dall'invasione angiolinfatica e perineurale. Questi tumori vengono classificati in ben differenziati, moderatamente differenziati e scarsamente differenziati. Il primo presenta caratteristiche simili al normale epitelio squamoso. Il secondo contiene pleomorfismi nucleari e attività mitotica, comprese mitosi anormali, presenterà inoltre un grado di cheratinizzazione inferiore. Infine, nel tipo scarsamente differenziato predominano cellule immature, con numerose mitosi tipiche e atipiche, e la cheratinizzazione è minima. Per quanto riguarda la cheratinizzazione, sebbene sia più probabile che sia presente nelle prime due tipologie tumorali, essa non dovrebbe rappresentare un importante criterio istologico nella classificazione del carcinoma a cellule squamose. La maggior parte di questi tumori sono moderatamente differenziati, quindi, un grading effettuato utilizzando il parametro della differenziazione risulta di valore prognostico limitato rispetto al pattern di invasione.

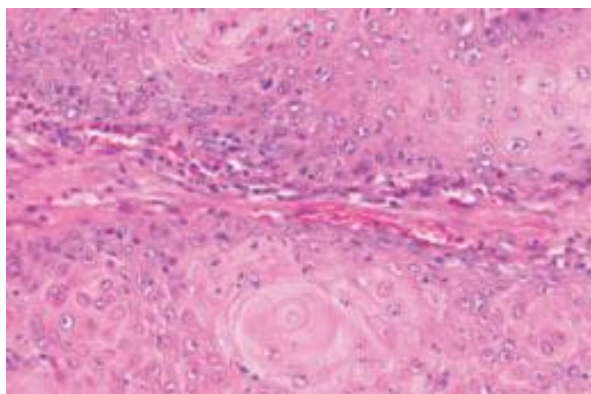


Figura 9. Carcinoma cellule squamose, tipo ben differenziato.

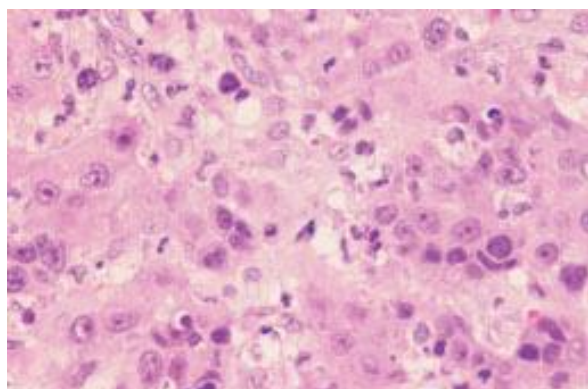


Figura 10. *Carcinoma cellule squamose, tipo scarsamente differenziato.*

Per quanto riguarda il fronte invasivo, a questo livello la crescita tumorale può mostrare un pattern espansivo, un pattern infiltrativo o entrambi. Il pattern espansivo è caratterizzato da ampie isole tumorali con margini di invasione ben definiti ed è associato ad una prognosi migliore. Il pattern infiltrativo è caratterizzato da piccoli cordoni irregolari sparsi o da singole cellule tumorali, con margini infiltrativi scarsamente definiti ed è associato ad un decorso più aggressivo [117].

Per quanto concerne la reazione stromale, il tumore a cellule squamose di tipo invasivo è quasi sempre accompagnato da una reazione stromale che consiste in una desmoplasia con deposizione di matrice extracellulare e proliferazione di miofibroblasti [118]. La neovascolarizzazione è frequentemente riscontrabile.

Dal punto di vista del profilo immunologico, il carcinoma a cellule squamose esprime marcatori epiteliali come le citocheratine. Gli schemi di espressione dei sottotipi di citocheratina possono variare durante la trasformazione maligna e riguardano il grado istologico, il grado di cheratinizzazione e la probabilità di metastasi. Il tumore a basso grado esprime citocheratine a peso molecolare medio-alto, ma non citocheratine a basso peso molecolare, analogamente al normale epitelio squamoso. Al contrario il tumore ad alto grado

tende a perdere l'espressione di citocheratine a medio-alto peso molecolare, ed esprime citocheratine a basso peso molecolare [119]. Il tumore ad alto grado inoltre può esprimere vimentine [120]. Tramite microscopia elettronica è possibile notare la presenza di desmosomi e tonofilamenti adesi a questo tipo di tumore [121].

1.7 CLASSIFICAZIONE TNM, STADIAZIONE, GRADING

Il sistema di classificazione TNM rappresenta l'espressione dell'estensione anatomica della lesione ed è basato sulla valutazione di tre componenti: "T" corrisponde alla dimensione del tumore primitivo, "N" indica la presenza e il grado di coinvolgimento dei linfonodi regionali, ed "M" esprime la presenza o assenza di metastasi a distanza. La stadiazione del cancro è volta allo sviluppo di linee guida relative alla terapia e alla sopravvivenza a cinque anni.

La classificazione clinica cTNM si basa su dati che vengono raccolti prima della terapia attraverso l'esame obiettivo, le tecniche di immagine, le biopsie ed altri esami specifici. Sarà poi necessaria la conferma tramite esame istologico.

Categoria T	Criteri
TX	Non è possibile individuare il tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ (il tumore non ha superato la membrana basale)
T1	Tumore con spessore ≤ 2 cm, con un DOI ≤ 5 mm
T2	Tumore ≤ 2 cm, con un DOI > 5 mm ma ≤ 10 mm Tumore > 2 cm ma ≤ 4 cm, con un DOI ≤ 10 mm
T3	Tumore > 4 cm; oppure un DOI > 10 mm
T4	Tumore primitivo in stadio avanzato
T4a	<i>Labbro</i> : tumore che invade la corticale ossea o il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale o la cute del viso. <i>Cavo orale</i> : tumore che invade le strutture anatomiche adiacenti (es. la corticale ossea, il seno mascellare o la cute del viso). Nota: l'erosione superficiale dell' osse / alveolo dentale (da sola) da parte di un tumore primario localizzato gengivalmente non è sufficiente per classificare un tumore come T4
T4b	<i>Cavo orale</i> : tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o la carotide interna.

Tabella 4. Parametro T (descrizione della grandezza e dell'estensione del tumore solido).

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

Tabella 5. Parametro cN (valutazione del coinvolgimento di linfonodi regionali, effettuata prima della terapia).

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

Tabella 6. Parametro pN (valutazione del coinvolgimento di linfonodi regionali, effettuata se il paziente è idoneo per una terapia chirurgica).

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

Tabella 7. Parametro M (presenza/assenza di metastasi lontane dal tumore primario).

La classificazione patologica pTNM deriva dall'esame completo dei campioni operatori e quindi può essere applicata solo ai casi trattati chirurgicamente. Nella definizione delle categorie si prendono in considerazione le stesse caratteristiche della cTNM, ma tramite

misure effettuate al microscopio. Le varie combinazioni dei parametri T, N ed M vengono raggruppate in stadi allo scopo di facilitare l'analisi statistica e definire una stratificazione della prognosi [122].

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

Tabella 8. Stadiazione.

L'evidenza che quanto più un tessuto neoplastico si discosta dalle caratteristiche istologiche della controparte normale, tanto maggiore è la sua aggressività biologica e tanto peggiore è la prognosi ha portato ad una categorizzazione diagnostica istopatologica (G) per il carcinoma orale secondo Broders.

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

Tabella 9. Grado istologico.

CAPITOLO 2: INFILTRAZIONE PERINEURALE

2.1 INTRODUZIONE

L'invasione perineurale (PNI) è una forma distinta di diffusione metastatica, indipendente dall'invasione vascolare e linfonodale [123]. È ormai dimostrato che le cellule tumorali mostrano un tropismo per il tessuto nervoso presente nei tessuti circostanti. La PNI è un meccanismo di diffusione tumorale attraverso la via nervosa che rappresenta un ostacolo all'eradicazione del tumore [124]; essa è correlata ad una scarsa sopravvivenza e a una maggiore probabilità di metastasi [125-126].

La PNI è particolarmente comune nei tumori della regione testa-collo, della prostata e del colon-retto [123]. Il carcinoma a cellule squamose, il tumore il più comune della regione testa-collo, ha tipicamente un'elevata prevalenza di PNI [127].

La presenza di PNI rende difficile stabilire il controllo locale di una lesione maligna perché le cellule neoplastiche possono viaggiare lungo i tratti nervosi e migrare lontano dalla lesione primaria, localizzandosi in siti lontani che non vengono asportati durante l'intervento chirurgico [128].

La PNI aumenta la probabilità di recidiva nei linfonodi; pertanto, la rilevazione di PNI nel carcinoma a cellule squamose può portare alla selezione del trattamento con radiazioni ionizzanti e/o dissezione elettiva dei linfonodi.

La PNI inizialmente è asintomatica; infatti, il dolore e la parestesia sono associati all'invasione dei grandi fasci nervosi che fungono da condotti “apri pista” per l'estensione intracranica. Il nervo trigemino con le sue branche e il nervo facciale sono i nervi più frequentemente coinvolti. Questi presentano anche un'ampia rete di fibre e interconnessioni

tra loro che possono servire alla migrazione delle cellule tumorali. La PNI è spesso asintomatica, tuttavia, la diffusione neurale può causare specifici sintomi come dolore, parestesia, debolezza muscolare, intorpidimento e formicoli. Nei casi avanzati, la completa denervazione può indurre atrofia muscolare [129].

2.2 NERVO E NICCHIA PERINEURALE

I nervi periferici sono aggregati di assoni, cellule e tessuti di supporto, tra cui cellule di Schwann, fibroblasti e vasi sanguigni. Le cellule di Schwann mantengono e riparano gli assoni mielinizzati e non mielinizzati e producono mielina nel sistema nervoso periferico [130]. Gli assoni e i capillari sono avvolti dall'endonevrio, che consiste di collagene, matrice extracellulare e fibroblasti. Gli assoni e l'endonevrio sono raggruppati in fascicoli dal perinevrio, che ha uno o più strati di cellule simil-epiteliali [130]. Queste cellule sono strettamente unite da tight junction e dalla presenza di membrane basali su entrambi i lati, fornendo una barriera tra i tessuti e gli assoni circostanti. I fascicoli sono raggruppati dall'epinevrio, una guaina che circonda l'intero nervo, fornendo l'apporto di sangue ai nervi ma privo di vasi linfatici. L'epinevrio ha uno strato esterno di tessuto connettivo lasso e uno strato interno contenente collagene e fibre elastiche. I vasi sanguigni si trovano frequentemente nella nicchia perineurale poiché i nervi spesso seguono la distribuzione vascolare anatomica in tutto il corpo.

2.3 DEFINIZIONE DI PNI

Uno dei limiti nella letteratura riguardo la PNI è l'assenza di una chiara e standardizzata definizione/classificazione. Batsakis (1985) ha definito la PNI come invasione delle cellule tumorali dentro, intorno e attraverso il nervo. Nel 2009, Liebig et al. hanno descritto la PNI come la presenza di "tumore in prossimità di un nervo e coinvolgente almeno il 33% della sua circonferenza o cellule tumorali all'interno di uno dei 3 strati della guaina nervosa o tumore localizzato in prossimità del nervo e che interessa almeno 1/3 della sua circonferenza" [123].

La definizione di "stretta prossimità" e la soglia del 33% sono empiriche e arbitrarie, nonché inclini all'interpretazione individuale. Pertanto, vi è una grande variabilità anche tra i patologi certificati su come rilevare e descrivere la PNI [131]. Quindi, le definizioni attuali non sono perfette e formulare una definizione oggettiva e ampiamente accettata per la PNI è veramente impegnativo. Inoltre, non è chiaro se una definizione debba essere applicata a tutti i tipi di cancro o se i tumori con neurotropismo elevato dovrebbero essere considerati come una categoria a parte, suggerendo ulteriori informazioni sull'interazione tumore-nervo. Le cellule tumorali non crescono passivamente lungo i nervi ma penetrano invece nel perinevrio in modo diretto e continuo, diventando intimamente associate alle cellule e agli assoni di Schwann nell'endonevrio [132]. Ulteriori studi hanno anche smentito delle concezioni passate, dimostrando che il perinevrio e l'endonevrio sono privi di canali linfatici [133]. È noto che alcuni tipi specifici di tumore presentano una caratteristica invasione neurale, mentre altri tumori più aggressivi non riescono a farlo anche a stadi avanzati; per questo si ritiene che vi siano complesse interazioni biologiche tra determinate cellule tumorali e nervi quando si tratta di PNI [134]. Lo spazio perineurale fornisce un

microambiente adatto alla crescita delle cellule da neoplasie neurotropiche, probabilmente a causa di fattori cellulari e dei loro rispettivi recettori che attraggono le cellule tumorali e ne stimolano la crescita lungo i nervi mediante una disregolazione dei geni associati al ciclo cellulare, al citoscheletro e all'interazione matrice extracellulare-cellula che influenzano la produzione di fattori neurotropici e molecole di adesione che contribuiscono alla PNI [135].

2.4 INCIDENZA DELLA PNI NEI CARCINOMI A CELLULE squamose

Il termine carcinoma a cellule squamose raggruppa lesioni con un'architettura microscopica simile ma con eterogeneità eziologiche, del comportamento clinico e della posizione. Ciò potrebbe concorrere all'ampia variazione dei tassi di PNI nei diversi tipi di tumore, che vanno dal 5,2% al 90%. Ad esempio, il carcinoma squamocellulare del cavo orale ha un'alta prevalenza di invasione neurale, mentre quello del labbro inferiore tende ad avere una prevalenza minore [136]. Inoltre, i tumori avanzati hanno alti tassi di PNI che sembrano essere indipendenti dalla posizione [137]. L'uso dell'immunoistochimica (IHC) specifica per i nervi può essere utile per la diagnosi di PNI [138-139].

Due studi hanno riportato che l'esame della traiettoria nervosa e dell'IHC migliora il rilevamento di PNI in campioni in cui piccoli nervi sono incorporati nel tumore o mascherati da stroma desmoplastico [138-139]. La rivalutazione del carcinoma squamocellulare del cavo orale mediante IHC con l'uso di anticorpi monoclonali anti-S100 ha aumentato il rilevamento di PNI dal 30% all'82% [138]. Entrambi gli studi hanno evidenziato che la PNI è sottostimata ed entrambi hanno supportato l'uso di almeno 1 marker neurale per l'analisi dei campioni di carcinoma squamocellulare.

2.5 ESITO CLINICO

La PNI non è associata alla positività al papillomavirus umano (HPV). Sebbene sia stata riportata una sopravvivenza peggiore quando è presente PNI nei tumori orofaringei associati all'HPV [185], tale associazione non era significativa in una recente meta-analisi[186]. Esistono inoltre prove del fatto che la PNI è frequentemente associata a uno stadio T più elevato nei tumori positivi all'HPV, simile agli altri carcinomi a cellule squamose del testa-collo [140].

Non è chiaro se la PNI sia più diffusa tra i giovani pazienti con carcinoma squamocellulare del cavo orale. Tuttavia, sembrerebbe che i pazienti giovani (età < 40 anni) con carcinomi della lingua mostrino una sopravvivenza minore quando si presentano con PNI.

Quando i non fumatori sono stati confrontati con i fumatori abituali, la PNI è stata associata a tassi di ricorrenza più elevati per entrambi i gruppi [140]. Generalmente, la PNI è associata a una scarsa sopravvivenza globale e specifica alla malattia, con riduzione del tasso di sopravvivenza a 5 anni [141-144].

I tumori della cavità orale con PNI sono particolarmente inclini a recidivare loco-regionalmente e a livello linfonodale. La presenza di metastasi linfonodali è un fattore prognostico significativo nei carcinomi squamocellulari della regione testa-collo. Lo studio dello stato linfonodale (pN) tra i pazienti sottoposti a svuotamento linfonodale ha mostrato che la PNI è un fattore predittivo significativo delle metastasi linfonodali occulte al momento della diagnosi dei tumori della cavità orale [145, 146]. Sebbene sia difficile trarre conclusioni per ogni sito del testa-collo circa il ruolo della PNI nella previsione del coinvolgimento linfonodale, questa sembra essere più fortemente correlata ai tumori della cavità orale, in particolare i tumori della lingua [147].

La fisiopatologia dell'invasione e della metastasi nella PNI però è attualmente sconosciuta. Per comprendere meglio la prognosi del paziente, la PNI può essere definita in base alla posizione, alle dimensioni e al numero di nervi interessati. L'estensione della PNI al di fuori del margine del tumore era significativamente correlata con la durata della sopravvivenza libera da malattia [148]. Hanno classificato la PNI come assente, intratumorale (all'interno della massa tumorale) ed extratumorale (fuori dal bordo del tumore); la forma extratumorale è stata definita periferica quando il nervo interessato è compreso tra 0 e 0,2 mm dal margine del tumore. È interessante notare che questo studio ha mostrato che la PNI extratumorale e periferica erano associate a tempi di recidiva ridotti [148].

Inoltre si è visto che alcuni carcinomi orali si estendono di alcuni centimetri dalla lesione primaria [149]. Ciò è un problema nel carcinoma a cellule squamose delle labbra, che presenta un tasso più elevato di recidiva quando presenta PNI, è più difficile da controllare e può dimostrare la diffusione intracranica attraverso i nervi alveolari, facciali e trigeminali e la successiva invasione del sistema nervoso centrale, limitando così fortemente le opzioni di trattamento [150-152].

2.6 MARCATORI MOLECOLARI

La PNI può rappresentare una sfida nell'effettuare un'asportazione tumorale completa [143-153], presumibilmente a causa dell'estensione neurale lontana dal tumore primario, a un sito distante che non è stato asportato durante la valutazione dei margini chirurgici. Data la maggiore recidiva dei linfonodi e la più scarsa sopravvivenza associata alla PNI, è stato proposto un trattamento più aggressivo, sommato a terapie adiuvanti come lo svuotamento linfonodale e/o radioterapia [140, 154, 155].

Caratterizzare l'interazione tra i nervi e il cancro è importante per lo sviluppo di strategie di trattamento che mirano direttamente all'invasione neurale e per l'adozione di approcci di medicina personalizzati per il trattamento di pazienti con PNI.

La PNI è un'interazione complessa tra nervi e cellule tumorali, dove queste, invadono il perineurio per accedere alle cellule di Schwann e agli assoni all'interno dell'endoneurio [156]. La PNI è mediata da segnali molecolari che avviano e guidano il processo, promuovendo la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione delle cellule tumorali e la neuritogenesi [124, 157-159].

La migrazione delle cellule tumorali verso i nervi e quindi lungo il tronco nervoso all'interno dello spazio perineurale richiede probabilmente l'attivazione di numerose vie di segnalazione che coinvolgono fattori trofici, proteine di adesione della matrice extracellulare e regolatori della chemiotassi [124].

Complessi di adesione specifici e proteine della matrice extracellulare sono stati implicati anche come determinanti molecolari della PNI, con la convinzione che l'espressione di queste proteine da parte delle cellule tumorali possa facilitare l'interazione cellula-substrato, consentendo alle cellule tumorali di utilizzare cellule e tessuti neurali come via di diffusione [160]. Le molecole di adesione non solo mediano il legame cellulare, ma attivano anche le vie di trasduzione del segnale associate alla morfogenesi in determinate condizioni fisiologiche e patologiche. Le alterazioni nelle aderenze cellula-cellula e cellula-matrice sono considerate fattori importanti nella crescita e nella diffusione del carcinoma orale [161].

L'invasione del perineurio da parte delle cellule tumorali e il loro movimento lungo il nervo richiedono una comunicazione che probabilmente si avvale dei processi di rigenerazione dei nervi e può essere mediata attraverso le cellule nella nicchia perineurale, da fattori solubili e

da loro recettori [124]. Sono inclusi in questo gruppo fattori di crescita, proteine che regolano la chemiotassi, proteine di adesione della matrice extracellulare, macrofagi, cellule stellate e cellule di Schwann [124]. Nei carcinomi a cellule squamose, la maggior parte degli studi su queste proteine ha studiato l'espressione di proteine o trascrizioni in regioni di PNI. (Tab. 10).

Marker Molecolare	Classe	Rilevanza	Riferimento
NGF (nerve growth factor)	Neurotrofine	L'espressione è associata a PNI, sopravvivenza peggiore e metastasi linfonodali; NGFR aumenta il fenotipo invasivo in SCC	Kolokythas et al. 2010; Shen et al. 2014; Yu et al. 2014; Chen et al. 2016
BDNF (brain-derived neurotrophic factor)	Neurotrofine	L'over espressione di TrkB (BDNF receptor) induce EMT	Kupferman et al. 2010
GDNF (glial-derived neurotrophic factor), artemin	Neurotrofine	GDNF sembra regolare la migrazione delle cellule tumorali; l'espressione dell'artemina è correlata a una fase avanzata della malattia	Chuang et al. 2013; Gao et al. 2014
Semaforina 4D	Proteina che guida gli assoni	Assogenesi, aumento densità nervosa	Binmadi et al. 2012
Slit-Robo	Proteina chemiotattica e di guida degli assoni	Slit-2 riduce la migrazione delle cellule del SCC	Bauer et al. 2011
Galanina	Neuropeptide	Promuove cancerogenesi e neuritogenesi	Scanlon et al. 2015
CX3CL1 / CX3CR1 (fractalkine and fractalkine receptor)	Proteina chemiotattica	L'espressione di CX3CL1 non è associata a PNI	Doumas et al. 2015
Galectina 1	Proteina chemiotattica	L'espressione di Galectina 1 dai linfociti in zona perineurale è associata a scarso outcome	Chawla et al. 2016
Citochina A	Proteina chemiotattica	L'espressione è associata a PNI e peggioramento sopravvivenza	Chang et al. 2010
NCAM (neural cell adhesion molecule)	Proteina di adesione della ECM	L'espressione è associata a PNI	Vural et al 2000*
Laminina 5	Proteina di adesione della ECM	L'espressione è associata a PNI	Anderson et al. 2001; Tarsitano et al. 2016
ICAM-5 (telencephalin)	Proteina di adesione Intercellulare	L'espressione è associata a PNI	Maruya et al. 2005
Claudina 1	Proteina di adesione Intercellulare	L'espressione è associata a PNI	Dos Reis et al. 2008; Sappayatosok and Phattarataratip 2015
IMP3 (IGF-II mRNA binding protein 3)	Proteina legante l' mRNA	L'espressione è associata a PNI e predittore indipendente di morte	Tarsitano et al. 2016
BAG1 and Bim/Bod	Proteina Anti- e Pro-apoptotica	L'espressione è associata a PNI	Coutinho-Camillo et al. 2010

Tabella 10. *Markers molecolari della PNI nei carcinomi squamocellulari della regione testa-collo [187].*

Neurotrofine

Le neurotrofine sono proteine che, con i loro recettori, promuovono la crescita neuronale e la PNI [123]. Le neurotrofine studiate nei carcinomi squamocellulari includono il nerve growth factor (NGF), brainderived neurotropic factor (BDNF), and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF).

L'NGF è un peptide neurotrofico che è stato collegato a PNI in tumori multipli [162]. NGF e TrkA, il suo recettore tirosin chinasi, sono maggiormente espressi nei carcinomi squamocellulari adiacenti alle aree di PNI [162]. Gli studi sui carcinomi orali hanno mostrato che l'espressione di NGF nelle cellule tumorali era correlata a metastasi di PNI e linfonodi.

Il BDNF promuove la crescita e la differenziazione del sistema nervoso [156]. Il carcinoma adenoideo cistico, un tumore neurotropico nella regione della testa e del collo, presenta un'espressione citoplasmatica diffusa di BDNF indipendentemente dalla presenza di PNI [163]. Sebbene il BDNF non sia stato studiato nei carcinomi squamocellulari, il recettore della chinasi-B correlato alla tropomiosina (un recettore tirosina chinasi che è attivato dal BDNF e dal fattore neurotrofico 4) regola l'invasione nei carcinomi squamocellulari [164]. Dato il suo ruolo importante nel sistema nervoso e nell'invasione nei carcinomi squamocellulari, lo studio del ruolo di BDNF nella PNI può essere rilevante per la progressione del tumore. Inoltre, l'esplorazione del ruolo della neurotrofina 4 nella PNI sarebbe importante.

Il GDNF è una famiglia di neurotrofine strutturalmente distinta che include GDNF, neurturina, artemina e persepina, che segnalano attraverso RET, un recettore tirosin-chinasi [156]. Nei carcinomi squamocellulari, il GDNF promuove la migrazione cellulare tramite MAP chinasi, fattore di trascrizione AP-1 e metalloproteinasi della matrice [165], ma

il suo ruolo nella PNI non è chiaro. La proteina Artemina, un membro della famiglia GDNF, è sovraespressa nel carcinoma squamocellulare laringeo ed è associata a scarsa sopravvivenza e ad alto stadio del tumore [166].

Fattori che promuovono la assonogenesi, neurogenesi, e crescita tumorale

I modelli emergenti di PNI suggeriscono fortemente che le interazioni tra cellule tumorali e nervi non solo inducono la migrazione delle cellule tumorali ma stimolano anche l'assonogenesi, o l'allargamento dell'estensione degli assoni nervosi o un aumento del numero di assoni, e la neurogenesi, un aumento del numero di cellule corporee dei neuroni, che può condurre aumento della densità nervosa all'interno e attorno alle neoplasie neurotrope [167-169]. Il cancro migliora l'assonogenesi o l'espansione dei neuriti, che sembrano essere essenziale per la PNI [157-159]. Le proteine che regolano la guida degli assoni hanno un ruolo significativo nel cancro [156].

Ad esempio, la Semaforina 4D nel carcinoma squamocellulare è stata correlata con il fenomeno dell'assonogenesi [170]. In particolare, la Semaforina 4D ha funzioni sia attraenti che repulsive; se si lega alla membrana respinge i neuriti, mentre le proteine secrete favoriscono la crescita dei neuriti [140, 171].

Proteine che regolano la chemiotassi

La galanina, un neuropeptide e fattore trofico putativo, si lega ai recettori della galanina GALR1, GALR2 e GALR3, noti anche come GAL 1, GAL 2 e GAL 3 [172]. GALR1 e GALR2 hanno ruoli opposti nei carcinomi squamocellulari: GALR1 è un soppressore del tumore [173], mentre GALR2 promuove la crescita tumorale [174]. Di conseguenza,

l'overespressione di GALR2 o la ridotta espressione di GALR1 possono far prevalere gli effetti indotti da GALR2.

Un recente studio ha dimostrato che la galanina di origine neurale promuovere l'invasione neurale mediante GALR2 nel carcinoma squamocellulare [159]. In particolare, GALR2 è capace di indurre la trascrizione mediata da NFATc2 di galanina e cicloossigenasi 2 che stimoleranno secrezione rispettivamente di galanina e prostaglandina E2 (PGE2). La galanina e PGE2 secrete dalle cellule tumorali inducono rispettivamente neuritogenesi e invasione (Figura 11)

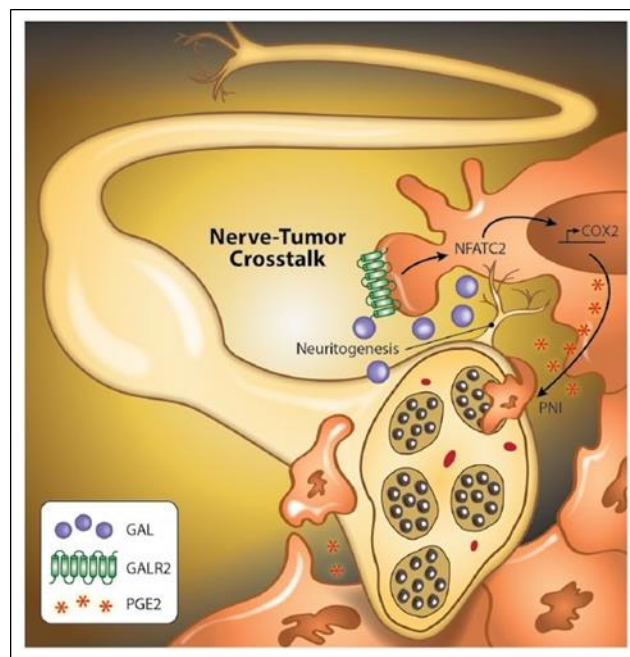


Figura 11. La Galanina secreta dai nervi induce l'espressione di GALR2 sulle cellule del SCC. La Galanina e il PGE2 inducono rispettivamente neuritogenesi e invasione [187].

La galectina 1 è stata collegata a più fenotipi oncogenici. In un piccolo studio sui carcinomi squamocellulari della regione testa-collo, un'elevata colorazione della galectina nelle popolazioni di linfociti adiacenti alle aree di diffusione perineurale è stata associata a scarsa sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale [175].

La sovraespressione dell'activin A, una TGF β , nel citoplasma delle cellule cancerose è associata alla PNI e alla scarsa sopravvivenza globale e libera da malattia. Sebbene la downregulation dell'attivina A inibisca l'invasione, la migrazione e la proliferazione delle cellule di carcinoma squamocellulare, il suo ruolo nella PNI non è ancora chiaro [176].

Proteine della matrice extracellulare

Le molecole proteiche di adesione cellulare promuovono l'invasione e la diffusione del tumore attraverso interazioni cellula-cellula e cellula-matrice [156].

La molecola di adesione delle cellule neurali (NCAM) è espressa da neuroni e cellule di Schwann [156]. Nei carcinomi squamocellulari della regione testa-collo, NCAM è stata riscontrata maggiormente nei tumori con PNI rispetto a tumori senza PNI [140]. Data l'importanza delle NCAM sulle cellule di Schwann nella PNI in adenocarcinomi pancreatici, sarebbe utile approfondire il ruolo della NCAM nel carcinoma squamocellulare [177].

La laminina 5 è una proteina della matrice extracellulare che è overespressa nelle cellule tumorali dei carcinomi squamocellulari PNI-positivi. L'espressione della laminina 5 da parte delle cellule tumorali, identificabile con la biopsia, è correlata all'invasione perineurale nei campioni chirurgici [178]. ICAM-5 o telencefalina è una molecola di adesione cellulare overespressa nei carcinomi squamocellulari e associata a PNI [179].

La claudina 1 e la claudina 4 sono proteine transmembrana che costituiscono le tight junction. La sovraespressione della claudina 1 è associata alla PNI, mentre l'espressione elevata della claudina 4 è associata ad un riscontro minore della PNI [180-181]. IMP3 è una binding-protein RNA coinvolta nella produzione dell'insulin-like growth factor II mRNA [182]; si visto che la sua espressione è predittiva di PNI nei campioni chirurgici ed è un perduttore indipendente di morte [153]. Bim/Bod e BAG1 sono proteine che rispettivamente promuovono e inibiscono l'apoptosi. La maggiore espressione di queste proteine nelle cellule tumorali è stata associata alla PNI [183].

CAPITOLO 3: SCOPO DEL LAVORO

Il carcinoma a cellule squamose rappresenta la tipologia più comune di carcinoma orale, interessando soprattutto la lingua, con una sopravvivenza complessiva che si attesta attorno al 50%. I fattori di rischio riconosciuti sono il consumo di tabacco e alcol e linfezione da HPV; tra i fattori di rischio minori si annoverano la masticazione del betel e le carenze nutrizionali. Nonostante l'aggiornamento della stadiazione TNM da parte dell'AJCC, i pazienti affetti da carcinoma orale non sono ancora stratificati in modo sufficientemente accurato dal punto di vista prognostico. Per questo motivo nel corso degli anni sono stati studiati numerosi marcatori prognostici per questa neoplasia, mediante l'impiego di tecniche di biologia molecolare e immunoistochimica, con risultati contrastanti. Nella ricerca di nuovi marcatori prognostici del carcinoma orale si è deciso di prendere in considerazione un fattore morfologico, la PNI, per valutarne la rilevanza prognostica.

Lo scopo di questo studio è stato quello di condurre un'indagine istopatologica retrospettiva su 154 casi di carcinoma squamocellulare della lingua al fine di valutare l'utilità prognostica della PNI, in analogia con le evidenze manifestate per altri tumori. Lo studio è stato condotto su carcinoma squamocellulare della lingua in virtù del fatto che questo rappresenta un gruppo estremamente omogeneo di tumori del cavo orale, quindi di più facile osservazione. La presenza di PNI è stata osservata grazie alla colorazione ematossilina-eosina, un tipo di tecnica utilizzata routinariamente nei laboratori di anatomia patologica, rappresentando un metodo di indagine rapido ed economico.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

4.1 SELEZIONE DEI CASI

Il presente studio retrospettivo ha esaminato una coorte di pazienti selezionati in maniera casuale con carcinoma squamocellulare della lingua (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.

La classificazione pTNM sono state riviste da 2 patologi esperti secondo la settima e ottava edizione dell'AJCC Cancer Staging Manual [188,189] e la quarta edizione della classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) dei tumori della testa e del collo [190].

I follow-up sono stati eseguiti per via telefonica da un singolo chirurgo (PB), 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.

4.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA

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). La presenza di Perineural Invasion (PNI) è stata confermata quando le cellule tumorali sono state identificate in uno dei 3 strati della guaina del nervo e / o il tumore era in stretta vicinanza del nervo, coinvolgendo più di un terzo della sua circonferenza. Per quanto riguarda la posizione, PNI è stata classificata come intratumorale o extratumorale. Inoltre, la PNI è stata sottoclassificata come focale o multifocale in base al numero di fuochi.

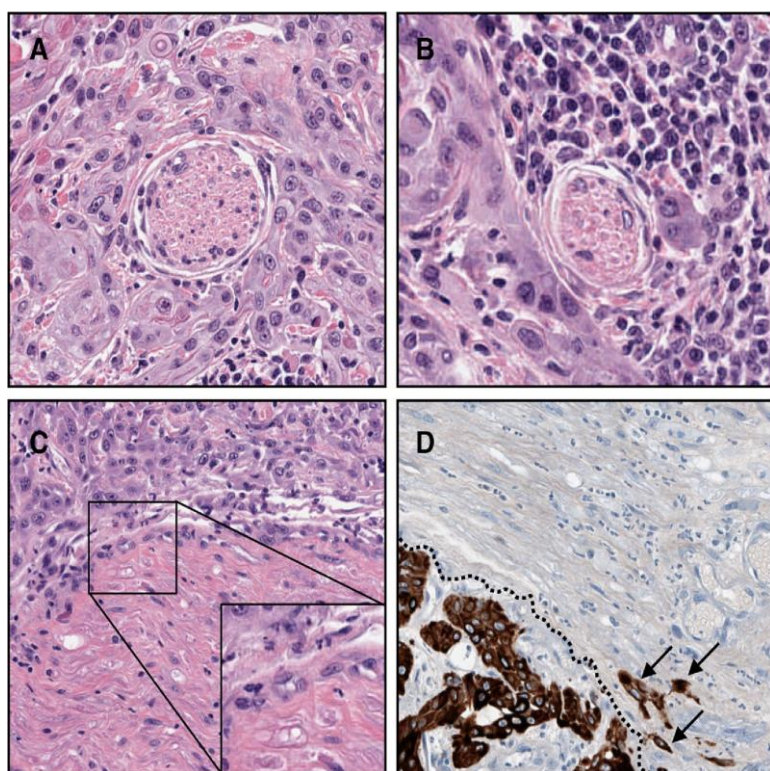


Figura 12. *Invasione perineurale in OSCC. (A) Cellule maligne che mostrano un coinvolgimento circonferenziale totale di un nervo in una sezione istologica colorata con ematossilina ed eosina. (B) cellule tumorali che coinvolgono circa un terzo della circonferenza del nervo. (C) Presenza di cellule tumorali all'interno della guaina nervosa. (D) Cellule tumorali all'interno della guaina del nervo, un esempio di invasione intraneurale, come evidenziato dalla colorazione con la pan-citocheratina. Le frecce nere e la linea tratteggiata rappresentano il confine del nervo (Binmadi, Basile. Oral Oncol. 47(2011):1005-10).*

CAPITOLO 5: RISULTATI

5.1 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). Per quanto riguarda il *grading*, 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. In questi pazienti è stato analizzato anche il livello di stadiazione (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 clinico-patologiche sono riassunte nella tabella 11.

Dati clinico-patologici	Gruppi	N° di pazienti (L)
Età	≤ 65 anni	81/154
	> 65 anni	73/154
Sesso	Uomo	94/154
	Donna	60/154
Grado	1-2	103/146
	3	43/146
Stadio	I-II	83/154
	III-IV	71/154

Tabella 11. *Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti inclusi nel presente studio.*

L'analisi di Spearman, analisi statistica non parametrica usata per mettere in correlazione età, *grading* e *staging*, ha mostrato un significativo aumento del *grading* all'aumentare dell'età ($p=0.037$), mentre la variazione di *staging* non è significativa rispetto all'età, dall'analisi è anche risultato che il *grading* correla con l'aumento dello *staging* ($p<0.001$) (Figura 13).

Correlazioni					
			Age	Grading	Staging_7thAJCC
Rho di Spearman	Age	Coefficiente di correlazione	1,000	-,173*	-0,071
		Sign. (a due code)		0,037	0,380
		N	154	146	154
	Grading	Coefficiente di correlazione	-,173*	1,000	,338**
		Sign. (a due code)	0,037		0,000
		N	146	146	146
	Staging_7thAJCC	Coefficiente di correlazione	-0,071	,338**	1,000
		Sign. (a due code)	0,380	0,000	
		N	154	146	154

*. La correlazione è significativa a livello 0,05 (a due code).

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

Figura 13. Correlazioni tra età, *grading* e *staging* con analisi di Spearman

5.2 ANALISI DI SOPRAVVIVENZA

Sono state eseguite analisi univariate e multivariate per verificare se la PNI possa influire sulla sopravvivenza. Nella figura 14 è rappresentata l'analisi di Kaplan-Meier, analisi univariata, considerando alcuni parametri significativi rispetto alla sopravvivenza. In figura 14, pannello A è mostrato il grafico prendendo in considerazione i parametri presenza o assenza di PNI. Dal grafico è evidente che la presenza di PNI influisce negativamente sulla sopravvivenza totale ($p<0.001$). Nel pannello B è mostrato lo stesso tipo di analisi mettendo

in correlazione oltre alla presenza o assenza di PNI anche il numero di *foci*. Come risulta evidente dal grafico la presenza di un unico *focus* fa variare in maniera negativa il tasso di sopravvivenza, questa differenza è ancora più evidente nel caso di tumori con PNI multifocali ($p<0.001$). Nel grafico inserito nel pannello C viene presa in considerazione la presenza di una PNI intratumorale, anch'essa come si legge dal grafico ha un'enorme influenza sulla sopravvivenza del paziente ($p<0.001$). Infine nel grafico riportato nel pannello D si analizza la presenza o assenza di una PNI peritumorale che influisce notevolmente sulla sopravvivenza del paziente ($p=0.002$).

L'analisi di Kaplan-Meier inoltre è stata importante per valutare il verificarsi di recidiva dopo la resezione del tumore con PNI. In figura 15 sono illustrati i grafici che riportano le analisi effettuate. Nel pannello A si nota una tendenza dei soggetti con tumore in presenza di PNI di andare incontro a recidiva rispetto ai soggetti con tumore senza PNI. Tale differenza risulta essere non significativa ($p=0,273$). Nel pannello B è mostrata la correlazione tra soggetti con tumore senza PNI, soggetti con tumore e PNI monofocale e infine soggetti con tumore e PNI multifocale, si può vedere come i soggetti con PNI monofocale hanno maggiore possibilità di avere recidive rispetto a coloro che non presentano PNI, mentre nel caso delle PNI multifocali tale differenza sembra meno evidente. In ogni caso tali differenze risultano essere non significative ($p=0,413$). Nel pannello C si valuta la recidiva dei soggetti che hanno avuto un tumore con PNI intratumorale rispetto a coloro che non hanno infiltrazioni di PNI. Come è evidente dal grafico sembra non ci siano differenze sostanziali rispetto alla probabilità di avere recidive tra i due gruppi ($p=0,570$). Infine nel pannello D è mostrato l'andamento delle recidive per i pazienti che hanno avuto PNI peritumorali rispetto ai pazienti con tumori senza PNI; dal grafico si nota come chi ha

avuto PNI peritumorali ha maggiore possibilità di recidiva, tale differenza non risulta però significativa ($p=0,253$).

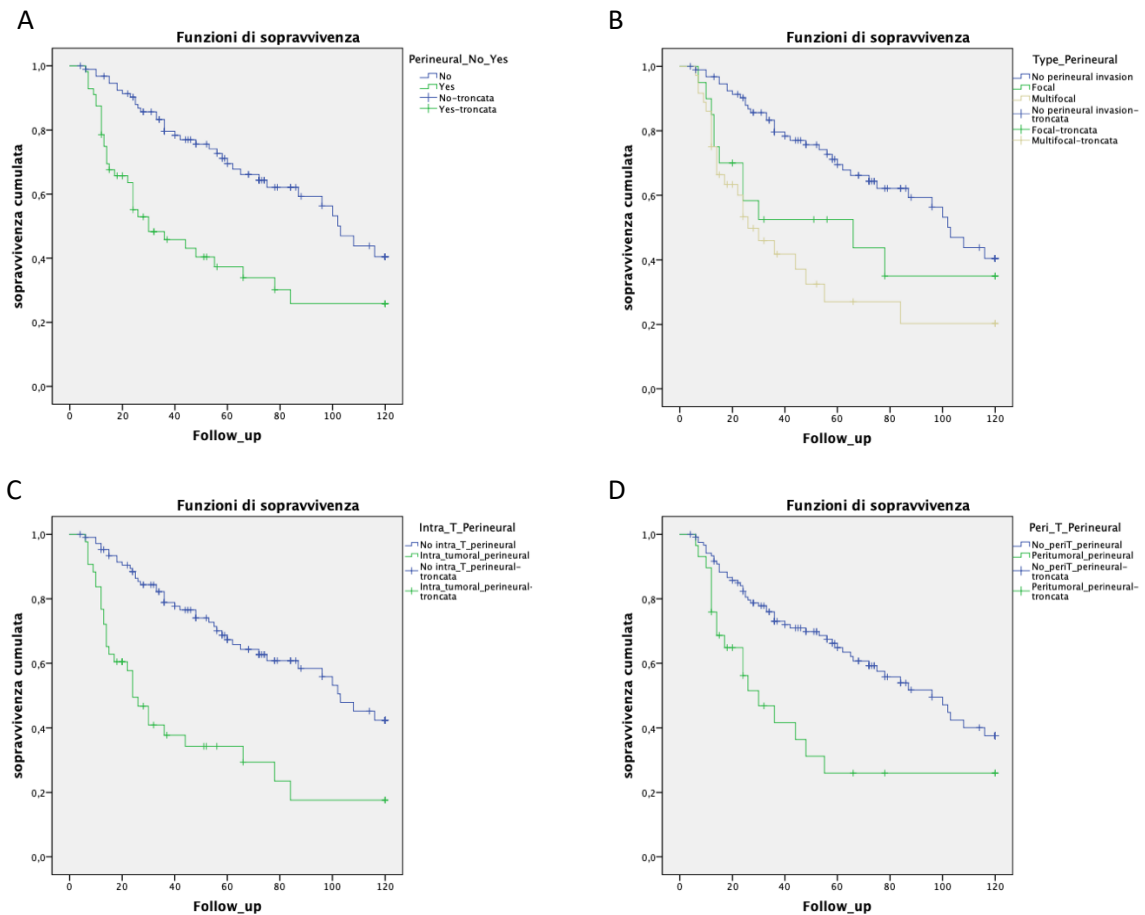


Figura 14. Analisi di Kaplan-Meier su tassi di sopravvivenza prendendo in considerazione

A) presenza/assenza di PNI B) presenza/assenza di PNI, uni o multifocale C) PNI intratumorale o non intratumorale D) PNI peritumorale o non peritumorale.

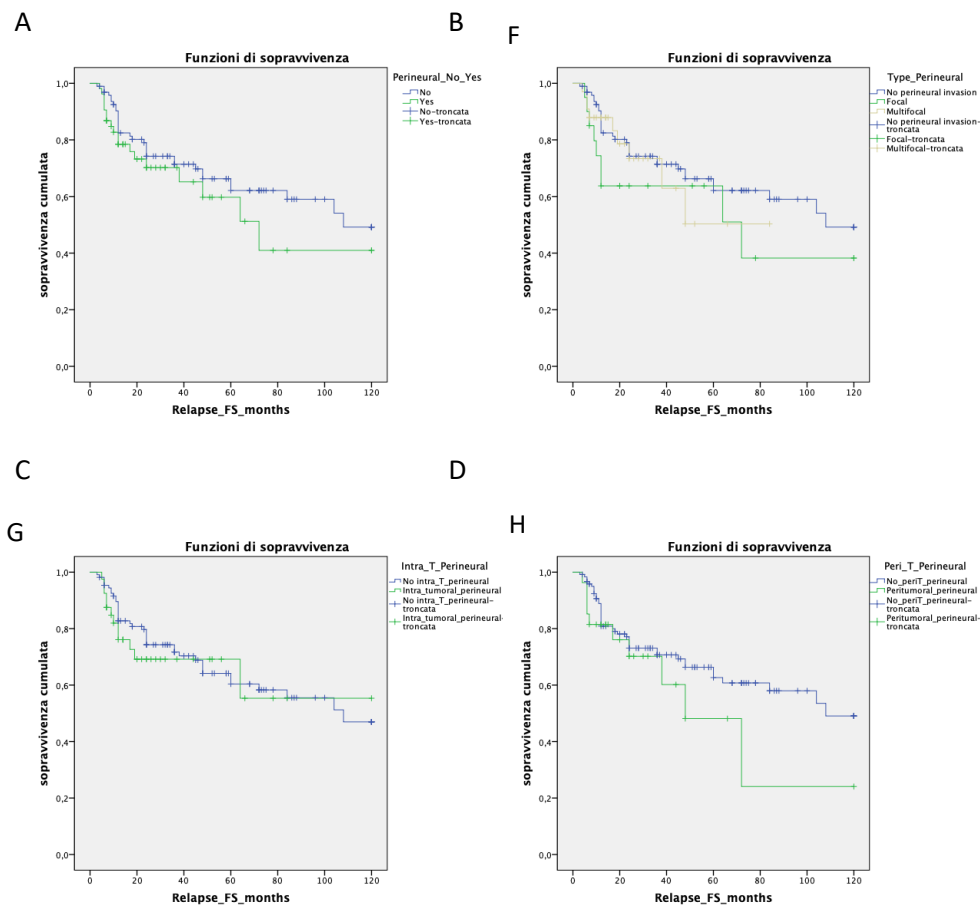


Figura 15. *Analisi di Kaplan-Meier sulla formazione di recidiva considerando come parametri A) presenza/assenza di PNI B) presenza/assenza di PNI, uni o multifocale C) PNI intra tumorale o non intra tumorale D) PNI peri tumorale o non peri tumorale.*

L'analisi multivariata di Cox prende in considerazione le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di chiarire il significato prognostico della PNI. In figura 16 la tabella A mostra che l'età, sesso, staging sono significativi rispetto al rischio di morte dato che $p < 0.05$; la presenza di PNI è risultato un fattore prognostico indipendente negativo, $p = 0.001$, con un rischio di morte di 2,286: ciò vuol dire che il paziente che presenta la PNI

ha un rischio 2 volte superiore di morire rispetto al paziente senza PNI indipendentemente dalle altre variabili in oggetto. La tabella B mette a confronto la tipologia di PNI ed evidenzia come i pazienti con PNI multifocale hanno maggior rischio di morire (Hazard ratio=2,47) sia dei pazienti con PNI unifocale (Hazard ratio=1,99) sia rispetto a coloro in cui non è stata rilevata presenza di PNI. Nella tabella C viene presa in considerazione la PNI intratumorale che ha un ruolo significativo nel rischio di morte; infatti coloro che hanno la PNI intratumorale hanno un rischio di morte circa 3 volte superiore. (Hazard ratio=3,22).

Infine nella tabella D è mostrato l'andamento per i pazienti che hanno avuto PNI peritumoral: tali pazienti hanno una maggiore probabilità di morte ma tale differenza risulta essere non significativa. L'analisi di Cox inoltre è stata utilizzata per valutare le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di valutare il significato prognostico della PNI per quanto riguarda il rischio di recidiva. In figura 17 nella tabella A queste correlazioni non risultano essere significative ($p > 0,05$). Nella tabella B si valuta la recidiva dei soggetti che hanno avuto un tumore con PNI intratumorale rispetto all'età, grading, staging e sesso. Come è evidente dalla tabella sembra non ci siano differenze sostanziali rispetto alla probabilità di avere recidive ($p > 0,05$). Infine nella tabella C è mostrato l'andamento delle recidive per i pazienti che hanno avuto PNI peritumoral: rispetto ai parametri sopra indicati; dalla tabella si nota come chi ha avuto PNI peritumoral ha maggiore possibilità di recidiva, tale differenza non risulta però significativa ($p = 0,63$).

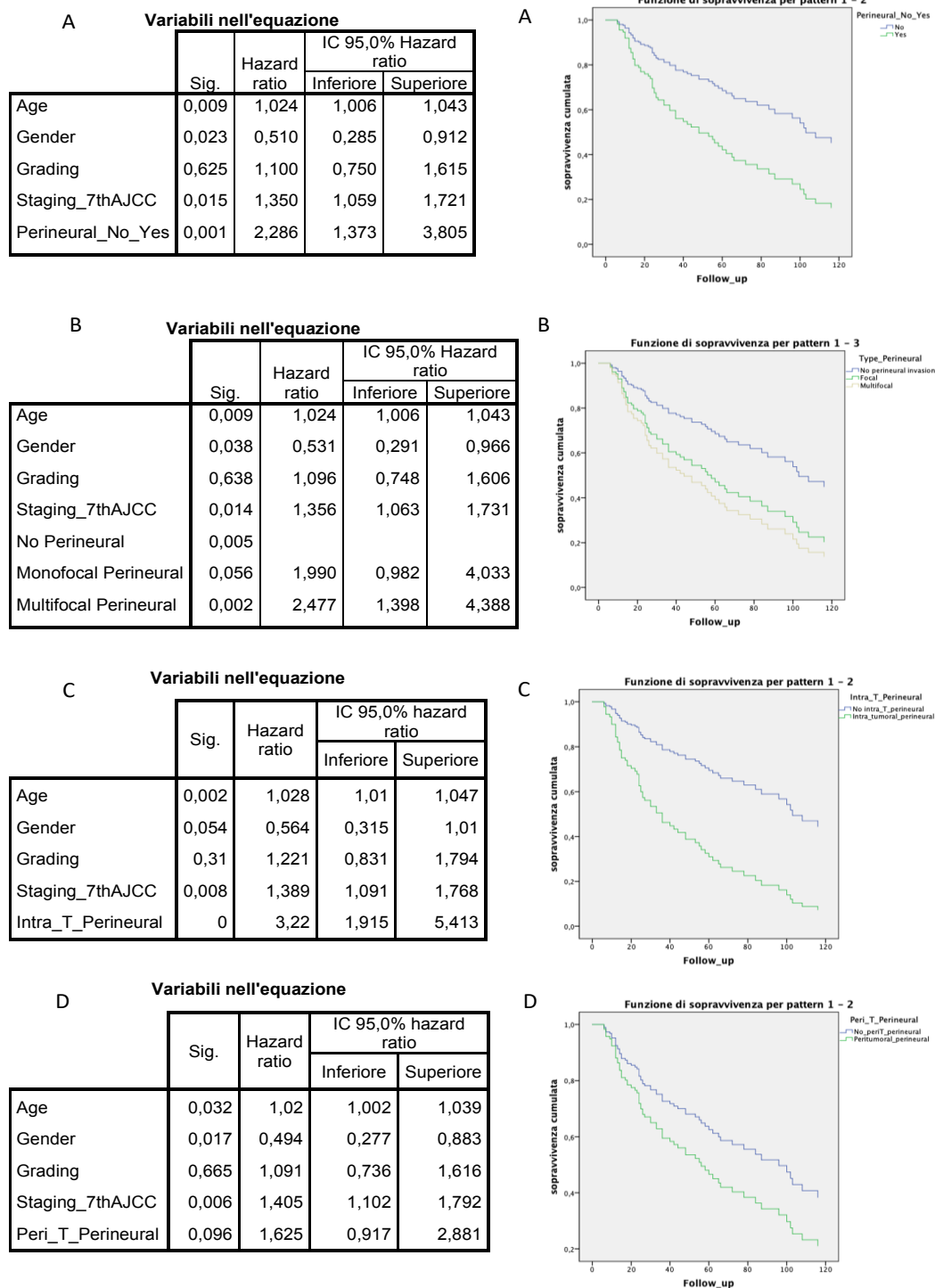


Figura 16. Tabelle e grafici di Cox che prendono in considerazione le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di chiarire il significato prognostico della PNI.

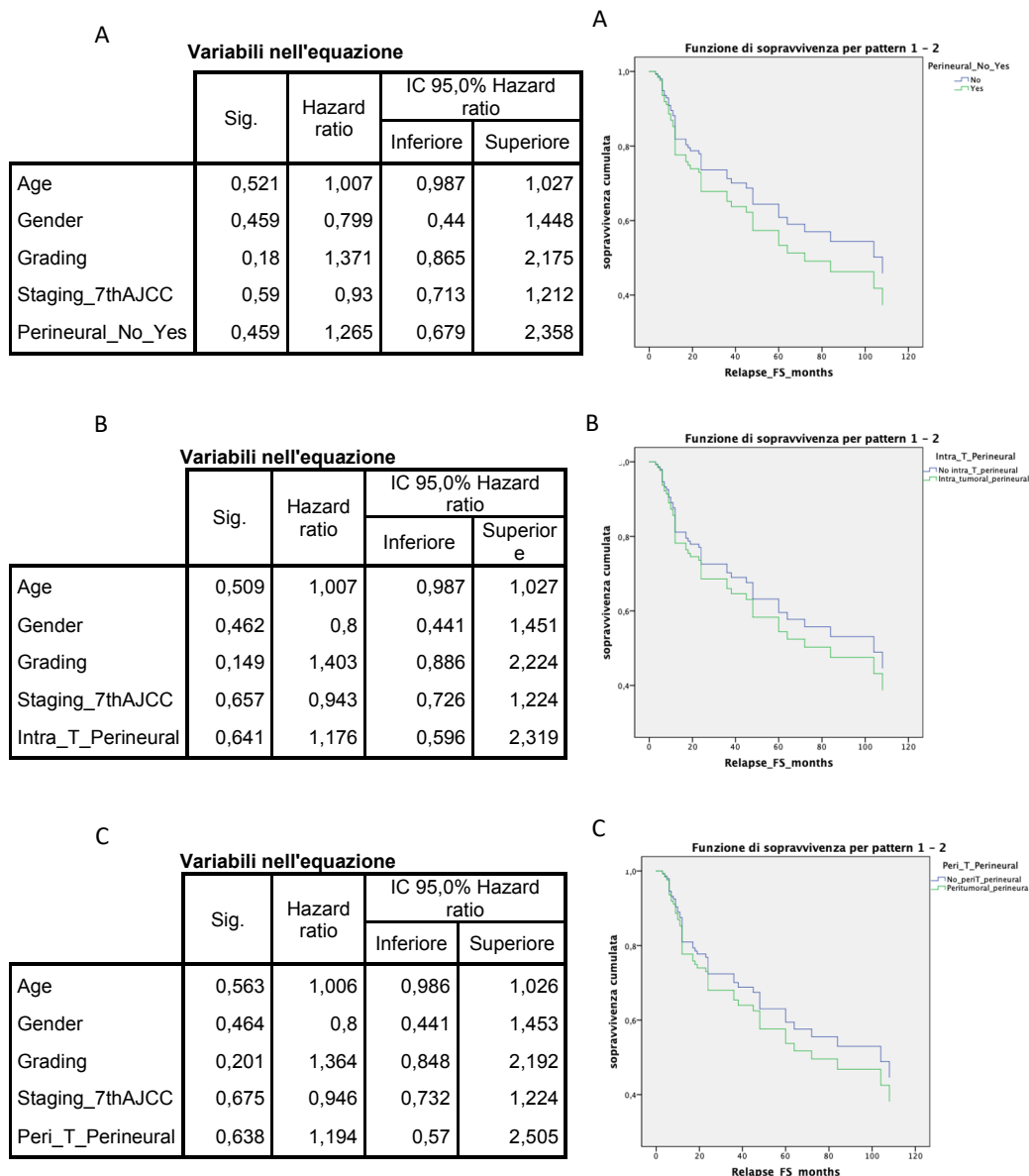


Figura 17. Tabelle e grafici di Cox che prendono in considerazione le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di chiarire il significato prognostico della PNI per quanto riguarda il rischio di recidiva.

CAPITOLO 6: DISCUSSIONE

La prognosi e la terapia nel OSCC sono attualmente basate sulla stadiazione del TNM, che viene determinato dall'esame clinico, dagli studi di imaging e dalle caratteristiche istopatologiche osservate nella biopsia, quindi da quei fattori di rischio che influenzano la prognosi del paziente [125]. Questi fattori, che includono il pattern di invasione del tumore, la presenza di PNI e la qualità della risposta linfocitaria, hanno dimostrato di essere predittori indipendenti statisticamente significativi sia di recidiva locale che di sopravvivenza globale, indipendentemente dallo stato dei margini tumorali [125]. Recentemente è stata pubblicata da Schmitd et al. una review che discute delle manifestazioni cliniche e prognostiche dei fattori associati alla PNI e del meccanismo della PNI nell'OSCC.

La PNI nel carcinoma della regione testa-collo è correlata ad una scarsa prognosi (Tabella 2), anche se alcuni studi non hanno mostrato una variazione nella prognosi nei pazienti positivi a tale fattore [203-204]. I fattori che determinano la grande variabilità nel rilevamento di PNI contribuiscono anche alle incongruenze nella sopravvivenza dei pazienti e nella recidiva del tumore. La maggior parte degli studi sui fattori prognostici nel SCC non sono stati incentrati a studiare il ruolo della PNI nella progressione e nella recidiva del tumore, e solo alcuni hanno riportato la presenza di PNI come scoperta accidentale [198]. Anche quando l'obiettivo era analizzare la PNI, gli studi erano prevalentemente analisi retrospettive che prendevano in considerazione pazienti con lo stesso tipo di tumore. Inoltre gli studi retrospettivi hanno limiti intrinseci, come le variazioni negli approcci terapeutici.

Table 2. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Outcomes Related to PNI Detected by Microscopic Analysis.	
Outcome Measure Associated with PNI	References
Overall survival ^a	Soo et al. 1986*; Brown et al. 1989*; Brandwein-Gensler et al. 2005 ^b ; Ling et al. 2013 ^{*b} ; Lanzer et al. 2014*; D'Cruz et al. 2015 ^{*c} ; Jardim et al. 2015 ^b ; Lin et al. 2015*; Garzino-Demo et al. 2016*; Fletcher et al. 2017 ^{*b}
Disease-specific survival ^d	Soo et al. 1986*; Brown et al. 1989*; Fagan et al. 1998*; Yuen et al. 2000*; Hinerman et al. 2004 ^{*b} ; Tai, Li, Chu, et al. 2012 ^b ; Tai, Li, Yang, et al. 2012; Chinn et al. 2013; Ling et al. 2013 ^{*b} ; Aivazian et al. 2015 ^{b,c} ; Lin et al. 2015*; Garzino-Demo et al. 2016*
Recurrence	
Local recurrence	Fagan et al. 1998*; Yuen et al. 2000*; Rahima et al. 2004; Brandwein-Gensler et al. 2005 ^f ; Aivazian et al. 2015 ^{e,f} ; Tarsitano et al. 2015 ^b
Locoregional recurrence	Hinerman et al. 2004 ^{*b} ; Durr et al. 2013 ^{*b} ; Chinn et al. 2013 ^b ; Jardim et al. 2015; Lin et al. 2015*
Regional recurrence (neck recurrence)	Soo et al. 1986*; Brown et al. 1989 ^{*b} ; Yuen et al. 2000*; Rahima et al. 2004 ^b ; Rodolico et al. 2004; D'Cruz et al. 2009 ^b ; Tai, Li, Chu, et al. 2012 ^b ; Tai, Li, Yang, et al. 2012 ^b ; Chatzistefanou et al. 2014 ^b ; Lanzer et al. 2014*; Tarsitano et al. 2015 ^b
Distant metastasis	Rahima et al. 2004 ^b
Presence of occult neck metastasis	Ross et al. 2004; Sparano et al. 2004; Nair et al. 2016 ^b
Presence of neck metastasis at diagnosis	Rahima et al. 2004 ^b ; Rodolico et al. 2004; Larsen et al. 2009; Tai, Li, Chu, et al. 2012 ^b ; Tai, Li, Yang, et al. 2012 ^b ; Chatzistefanou et al. 2014 ^b ; Jardim et al. 2015; Nair et al. 2016
PNI, perineural invasion.	
^A Overall survival considers deaths from all causes.	
^B Independent predictor.	
^C Prospective study.	
^D Disease-specific survival considers deaths only from the squamous cell carcinoma.	
^E For multifocal PNI.	
^F For nerves ≥ 1 mm diameter.	
*References cited with an asterisk are provided in the Appendix.	

La PNI non è associata alla positività al papillomavirus umano (HPV). Sebbene sia stata riportata una sopravvivenza peggiore quando è presente PNI nei tumori orofaringei associati all'HPV [185], anche se tale associazione non era significativa in una recente meta-analisi[186]. Esistono inoltre prove del fatto che la PNI è frequentemente associata a uno stadio T più elevato nei tumori positivi all'HPV, simile agli altri carcinomi a cellule squamose del testa-collo [140]. Nelle ultime 3 decadi, la diffusione e l'aumento delle infezioni da HPV hanno cambiato molto la presentazione clinica, il planning terapeutico e la prognosi. La maggior parte dei tumori HPV-correlati sono tumori squamosi non cheratinizzanti responsivi alla chirurgia e alla radioterapia con prognosi favorevole, aprendo l'opportunità di indagare su nuovi protocolli di trattamento finalizzati al ridimensionamento del trattamento. I

meccanismi biologici e molecolari alla base di questi fenotipi istologici (cheratinizzano e non cheratinizzato) non sono chiari. Le oncoproteine di HPV, specie E6 e E7, modulano la progressione del ciclo cellulare regolando la funzione di TP53 e RB agendo sulla crescita e differenziazione cellulare, rendendo immortali le cellule e prevenendo l'apoptosi. È probabile che queste alterazioni possano essere responsabili dello sviluppo di alterazioni microscopiche specifiche e di forme di metastasi specifiche (come PNI), anche se questo deve essere ben approfondito.

Non è chiaro se la PNI sia più diffusa tra i giovani pazienti con carcinoma squamocellulare del cavo orale. Tuttavia, sembrerebbe che i pazienti giovani (età < 40 anni) con carcinomi della lingua mostrino una sopravvivenza minore quando si presentano con PNI.

Quando i non fumatori sono stati confrontati con i fumatori abituali, la PNI è stata associata a tassi di ricorrenza più elevati per entrambi i gruppi [140]. Generalmente, la PNI è associata a una scarsa sopravvivenza globale e specifica alla malattia, con aumento della probabilità di metastasi loco-regionali e distanti e con riduzione del tasso di sopravvivenza a 5 anni [141-144].

I tumori della cavità orale con PNI sono particolarmente inclini a recidivare sia a livello locale che linfonodale; infatti la presenza di metastasi linfonodali è un fattore prognostico significativo nei carcinomi squamocellulari della regione testa-collo. Lo studio dello stato linfonodale (pN) tra i pazienti sottoposti a svuotamento linfonodale ha mostrato che la PNI è un fattore predittivo significativo delle metastasi linfonodali occulte al momento della diagnosi dei tumori della cavità orale [145, 146]. Sebbene sia difficile trarre conclusioni per ogni sito del testa-collo circa il ruolo della PNI nella previsione del coinvolgimento

linfonodale, questa sembra essere più fortemente correlata ai tumori della cavità orale, in particolare i tumori della lingua [147].

La PNI sembra essere l'indicatore prognostico più affidabile per la valutazione del tasso di recidiva regionale, poiché i tumori si ripresentano maggiormente nei linfonodi quando si rileva PNI. Questa associazione si è vista in molti altri settori del testa-collo (Tabella 2).

Rahima et al. (2004) indicano la PNI come un predittore indipendente di recidiva loco-regionale in una coorte mista di SCC della cavità orale e dell'orofaringe, e Tarsitano et al. (2015) hanno dimostrato questa correlazione per i tumori del cavo orale. Per altri siti della testa e del collo, come labbro inferiore, laringe e orofaringe, vi è evidenza di PNI come predittore significativo ma non indipendente di recidiva metastatica nel collo [136].

Altri studi hanno valutato invece l'associazione tra PNI e la recidiva locale. In uno studio retrospettivo su 522 pazienti con SCC del cavo orale, non vi era alcuna associazione tra PNI e recidiva locale o secondi tumori primari [190]. Tra gli studi che hanno trovato una significativa associazione tra recidiva locale e PNI [125,126,153,191], solo pochi sono stati in grado di mostrare PNI come predittore indipendente di recidiva locale [125,153].

Brandwein-Gensler et al. (2005) hanno riportato un'associazione indipendente tra un più alto tasso di recidiva locale e PNI solo se PNI si è verificato in nervi > 1 mm di diametro, mentre Tarsitano et al. (2015) hanno riportato risultati simili indipendentemente dalle dimensioni del nervo. La fisiopatologia dell'invasione e della metastasi nella PNI però è attualmente sconosciuta. Per comprendere meglio la prognosi del paziente, la PNI può essere definita in base alla posizione, alle dimensioni e al numero di nervi interessati. L'estensione della PNI al di fuori del margine del tumore era significativamente correlata con la durata della sopravvivenza libera da malattia [148]. Hanno classificato la PNI come assente,

intratumorale (all'interno della massa tumorale) ed extratumorale (fuori dal bordo del tumore); la forma extratumorale è stata definita periferica quando il nervo interessato è compreso tra 0 e 0,2 mm dal margine del tumore. È interessante notare che questo studio ha mostrato che la PNI extratumorale e periferica erano associate a tempi di recidiva ridotti [148]. Inoltre si è visto che alcuni carcinomi orali si estendono di alcuni centimetri dalla lesione primaria [149].

Le variazioni dell'importanza prognostica del riscontro istologico di PNI nei vari studi presi in considerazione potrebbero essere dovute alla dimensione dei nervi coinvolti, dove l'invasione di piccoli rami nervosi incidono meno sulla prognosi, rispetto ai nervi più importanti. Mentre una review di Woolgar cita prove che l'OSCC che presenta PNI, sia nei grandi nervi che in quelli di diametro inferiore (≤ 1 mm) sono tutti associati a tassi di sopravvivenza ridotti e ad un aumentato rischio di recidiva loco-regionale[110], altri confermano che è molto probabile che la prognosi peggiora quando sono coinvolti i nervi maggiori [192,193].

Nel tumore della regione testa-collo, la diffusione delle cellule neoplastiche avviene soprattutto attraverso i nervi maggiori, che fungono da condotti aripista per l'estensione intracranica della neoplasia. Il nervo trigemino con le sue branche e il nervo facciale sono i nervi più coinvolti. Questi presentano anche un'ampia rete di fibre e interconnessioni tra loro che possono servire alla migrazione delle cellule tumorali. La PNI è spesso asintomatica, tuttavia la diffusione neurale può causare specifici sintomi come dolore, parestesia, debolezza muscolare, intorpidimento e formicolii. In effetti, laddove sono presenti sintomi clinici di invasione del nervo facciale, come parestesia o paralisi, le percentuali di pazienti che presentano metastasi e morte sono notevolmente aumentate sia per le neoplasie delle

ghiandole salivari, sia per i carcinomi della pelle e del testa-collo [152,194]. Ciò è un problema nel carcinoma a cellule squamose delle labbra, che presenta un tasso più elevato di recidiva quando presenta PNI, è più difficile da controllare e può dimostrare la diffusione intracranica attraverso i nervi alveolari, facciali e trigeminali e la successiva invasione del sistema nervoso centrale, limitando così fortemente le opzioni di trattamento [150-152].

A volte, nei casi avanzati, la completa denervazione può indurre atrofia muscolare. Il ruolo di queste alterazioni nel trattamento del pz con OSCC sono ancora controverse e in fase di studio. È necessario capire meglio i meccanismi biologici e molecolari per trattare la PNI come parte integrante del trattamento di pz con OSCC in stato avanzato.

In una review di Binmadi et al., si sostiene che L'estensione neurale dell'OSCC può essere dimostrata non solo mediante risonanza magnetica e TC, ma anche attraverso un esame istologico approfondito del tessuto biopsiato. Mentre sia il Royal College of Pathologists nel Regno Unito, sia il College of American Pathologists [195] richiedono la registrazione della presenza o dell'assenza di invasione del spazio perineurale di carcinomi testa e collo, in particolare quando si riscontra davanti al fronte invasivo del tumore, l'accuratezza dell'analisi PNI è controversa e spesso soggettiva. In OSCC esiste una marcata variazione nella frequenza della segnalazione PNI, che varia da un minimo che oscilla tra il 2% e il 30% [20–23] a un massimo dell'82%, [127] con un aumento dei tassi di rilevazione in quelle biopsie che vengono appositamente rianalizzate per rilevare PNI o quando vengono utilizzate alcune colorazioni neurali. Altre preoccupazioni nel rilevamento della PNI nell'esame dei tessuti sono la tecnica della biopsia, la preparazione dei vetrini e il numero di sezioni istologiche esaminate. Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che l'accuratezza e il significato

prognostico della PNI in molti studi sull' OSCC potrebbero essere compromessi a causa di errori di sottostima.

Esiste una grande difficoltà in quanto non esiste una definizione accettata o standardizzata di PNI tra i patologi. Tuttavia, queste definizioni non riescono a fare una chiara distinzione tra diffusione "perineurale" o la scoperta di cellule tumorali all'interno e intorno allo spazio perineurale senza infiltrazione del fascicolo nervoso e diffusione "intraneurale" o penetrazione delle cellule tumorali all'interno del nervo stesso, dettagli che potrebbero essere difficili da determinare istologicamente ma che potrebbero influenzare la prognosi tumorale.

Sebbene tutti questi risultati supportino la PNI come fattore di rischio avverso, non è chiaro come dovrebbe essere misurato, se debba essere quantificato anziché essere segnalato come presenza o assenza e come l'identificazione di PNI dovrebbe influenzare la gestione clinica del pz con OSCC. La presenza di PNI incide in fase avanzata della malattia ed è uno dei fattori utilizzati per decidere riguardo la radioterapia o radiochemioterapia, (anche nei pazienti con linfonodi negativi). Alcuni studi suggeriscono la necessità di effettuare svuotamento linfonodale in tumori PNI positivi e linfonodi negativi e chirurgia radicale associata a trattamento adiuvante per tumori avanzati

Uno studio condotto nel 2007 da Wallwork e collaboratori non ha rilevato alcuna associazione statisticamente significativa tra PNI (o differenziazione del tumore) e la presenza di metastasi linfonodali nell'OSCC del pavimento della bocca [196]. Tuttavia, la preponderanza delle prove in letteratura suggerisce che la PNI è un indicatore prognostico significativo nella capacità dell'OSCC di dare metastasi linfonodali a livello cervicale e quindi dovrebbe essere presa in considerazione quando si considera lo svuotamento linfonodale o altre terapie aggiuntive [126,110,197,136].

Larsen et al. ha dimostrato che il coinvolgimento linfonodale al momento della diagnosi di OSCC era significativamente correlato alla PNI (così come al grado, alla presenza di invasione vascolare e all'aumento della profondità del tumore) [198]. Grado tumorale e PNI hanno dimostrato di essere predittori indipendenti di recidiva e coinvolgimento linfonodale in uno studio indiano su pazienti con T1-2, N0 di OSCC della lingua anteriore orale [199]. La PNI è correlata alla malattia in fase avanzata, infatti, vi è una forte tendenza all'invasione neurale nel carcinoma in fase avanzata, ma nessuna associazione con SCC in fase iniziale della lingua [200,201].

Soudry et al. ha dimostrato che i pazienti più giovani con OSCC avevano uno stadio N significativamente peggiore, una maggiore PNI e tassi più elevati di fallimento del trattamento e mortalità rispetto a una popolazione di pazienti più anziani [202]. I pazienti più giovani tendono a sviluppare una malattia più aggressiva e la PNI può essere un indicatore di questa aggressività, anche se Brandwein- Genesler e collaboratori non sono stati in grado di stabilire un legame tra la PNI e l'età del paziente [125]. I risultati di questo studio invece hanno indicato che vi è un significativo aumento del grading all'aumentare dell'età, mentre la variazione di staging non è significativa rispetto all'età, dall'analisi è anche risultato che il grading correla con l'aumento dello staging. Si è notato inoltre che vi è una tendenza dei soggetti con tumore in presenza di PNI di andare incontro a recidiva rispetto ai soggetti con tumore senza PNI, anche se tale differenza risulta essere non significativa.

Si è evidenziato come la presenza di PNI influisce negativamente sulla sopravvivenza totale, e analizzando la correlazione tra PNI e numero di foci, è risultato che la presenza di un unico focus fa variare in maniera negativa il tasso di sopravvivenza, e questa differenza è ancora

più evidente nel caso di tumori con PNI multifocali. Confrontando soggetti con tumore senza PNI, soggetti con tumore e PNI monofocale e infine soggetti con tumore e PNI multifocale, si può vedere come i soggetti con PNI monofocale hanno maggiore possibilità di avere recidive rispetto a coloro che non presentano PNI, mentre nel caso delle PNI multifocali tale differenza sembra meno evidente.

La presenza di PNI è risultato un fattore prognostico indipendente negativo, con un rischio di morte di 2,286: ciò vuol dire che il paziente che presenta la PNI ha un rischio 2 volte superiore di morire rispetto al paziente senza PNI indipendentemente dalle altre variabili in oggetto; e nel dettaglio si è visto come i pazienti con PNI multifocale hanno maggior rischio di morire sia dei pazienti con PNI unifocale sia rispetto a coloro in cui non è stata rilevata presenza di PNI. Si è verificato come la presenza di una PNI intratumorale e peritumorale ha un'enorme influenza sulla sopravvivenza del paziente. Prendendo in considerazione la PNI intratumorale che ha un ruolo significativo nel rischio di morte, si è visto che coloro che hanno la PNI intratumorale hanno un rischio di morte circa 3 volte superiore. Per quanto riguarda i pazienti che hanno avuto PNI peritumorali, essi hanno una maggiore probabilità di morte ma tale differenza risulta essere non significativa. Si è visto come soggetti che hanno avuto un tumore con PNI intratumorale non presenta differenze sostanziali per quanto riguarda la probabilità di avere recidive rispetto a coloro che non hanno infiltrazioni di PNI; mentre nel confrontando pazienti che hanno avuto PNI peritumorali rispetto ai pazienti con tumori senza PNI, si è notato che chi ha avuto PNI peritumorali ha maggiore possibilità di recidiva, anche se tale differenza non risulta però significativa.

Infine, valutando le variabili clinico-patologiche di età, grading, stadiazione e sesso, al fine di valutare il significato prognostico della PNI per quanto riguarda il rischio di recidiva, si

è visto che queste correlazione non risultano essere significative. Valutando la recidiva dei soggetti che hanno avuto un tumore con PNI intratumorale rispetto all'età, grading, staging e sesso, sembra non ci siano differenze sostanziali rispetto alla probabilità di avere recidive. Per concludere, la PNI è una sfida per la gestione multidisciplinare del cancro testa collo. La presenza di PNI necessità di un trattamento più aggressivo. L'escissione chirurgica dovrebbe coinvolgere il decorso nervoso fino a quando non si hanno margini liberi.

Gli insuccessi terapeutici nei pazienti con il carcinoma orale sono principalmente dovuti a recidive loco-regionali e metastasi a distanza. Tra i diversi parametri, la PNI è una caratteristica clinica e istopatologica ampiamente accettata che è spesso associata a malattie aggressive e una prognosi sfavorevole. Sebbene rappresenti un terzo distinto modo di metastasi tumorale, insieme all'invasione linfatica e dei vasi sanguigni, la PNI non è stata ben studiata fino ad ora. La mancanza di modelli sperimentali e una definizione accurata di PNI ha ostacolato i progressi verso la comprensione dei meccanismi di questo fenomeno. Il trattamento dei linfonodi del collo e la terapia adiuvanti sono obbligatori; la radioterapia ad intensità modulata offre vantaggi per ridurre la tossicità e gli effetti collaterali quindi migliorare la qualità della vita dei pazienti con carcinoma orale.

BIBLIOGRAFIA

1. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401–21.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359–86.
3. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, *et al.*, editors. Cancer incidence in five continents, vol. X. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
4. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50(5):387–403.
5. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 05/05/2016. [Internet]. 2013.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7–30.
7. Torre LA, Sauer AM, Chen MS Jr, Kagawa-Singer M, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: converging incidence in males and females. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(3):182–202.
8. Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, *et al.* Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol.* 2015;44(1):169–85.
9. Krishna Rao SV, Mejia G, Roberts-Thomson K, Logan R. Epidemiology of oral cancer in Asia in the past decade--an update (2000–2012). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5567–77.
10. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, *et al.* Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol.* 2008;13(3):220–8.

11. Bhurgri Y. Cancer of the oral cavity – trends in Karachi South (1995–2002). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(1):22–6.
12. Halboub ES, Al-Anazi YM, Al-Mohaya MA. Characterization of Yemeni patients treated for oral and pharyngeal cancers in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2011;32(11):1177–82.
13. Chiang CT, Hwang YH, Su CC, Tsai KY, Lian Ie B, Yuan TH, *et al*. Elucidating the underlying causes of oral cancer through spatial clustering in high-risk areas of Taiwan with a distinct gender ratio of incidence. *Geospat Health*. 2010;4(2):230–42.
14. Guneri P, Cankaya H, Yavuzer A, Guneri EA, Erisen L, Ozkul D, *et al*. Primary oral cancer in a Turkish population sample: association with sociodemographic features, smoking, alcohol, diet and dentition. *Oral Oncol*. 2005;41(10):1005–12.
15. Sherin N, Simi T, Shameena P, Sudha S. Changing trends in oral cancer. *Indian J Cancer*. 2008;45(3):93–6.
16. Rajkumar T, Sridhar H, Balaram P, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Nandakumar A, *et al*. Oral cancer in Southern India: the influence of body size, diet, infections and sexual practices. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12(2):135–43.
17. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):454–60.
18. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):309–16.
19. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, *et al*. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550–9.
20. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*. 2005;16(3):481–8.
21. Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, *et al*. The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *Int J Cancer*. 2010;127(1):160–71.
22. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429–35.

23. Anantharaman D, Muller DC, Laggiou P, Ahrens W, Holcatova I, Merletti F, *et al.* Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol.* 2016;45(3): 752–61.
24. Rose Ragin CC, Taioli E. Second primary head and neck tumor risk in patients with cervical cancer--SEER data analysis. *Head Neck.* 2008;30(1):58–66.
25. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Amarasinghe H, Subramanian S, Johnson N. Oral cancer: prevention, early detection, and treatment. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S, editors. *Cancer: disease control priorities*, vol. 3. 3rd ed. Washington DC: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank; 2015.
26. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R, *et al.* EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer.* 2009;45(6):931–91.
27. Gillison ML: Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007, 29:779-792.
28. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C: Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005, 41:244- 260.
29. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988, 48:3282-3287.
30. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE: *Oral and maxillofacial pathology*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders; 2002.
31. Neville BW, Day TA: Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002, 52:195- 215.
32. Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L: Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993, 72:1369-1375.
33. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I: Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993, 22:459-462.

34. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P: Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a casecontrol study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995, 31B:301-309.
35. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist LE: Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population- based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998, 82:1367-1375.
36. Moreno-Lopez LA, Esparza- Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez- Hernandez MJ, Dominguez- Rojas V: Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000, 36:170-174.
37. Silverman S, Jr., Griffith M: Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1972, 85:637-640.
38. Silverman S, Jr., Gorsky M, Greenspan D: Tobacco usage in patients with head and neck carcinomas: a follow-up study on habit changes and second primary oral/oropharyngeal cancers. *J Am Dent Assoc* 1983, 106:33-35.
39. Tepperman BS, Fitzpatrick PJ: Second respiratory and upper digestive tract cancers after oral cancer. *Lancet* 1981, 2:547- 549.
40. Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC: Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer* 1977, 40:1872-1878.
41. Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD: Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of “reverse” smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer* 1992, 50:172- 176.
42. Rodu B, Jansson C: Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15:252-263.
43. Warnakulasuriya S: Smokeless tobacco and oral cancer. *Oral Dis* 2004, 10:1-4.
44. Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS: Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *J Oral Pathol Med* 1995, 24:145-152.

45. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FS: Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol* 1985, 13:340-341.
46. Hashibe M, Ford DE, Zhang ZF: Marijuana smoking and head and neck cancer. *J Clin Pharmacol* 2002, 42:103S-107S.
47. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Marshall JR, Hsu TC, Schantz SP: Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, 8:1071-1078.
48. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA: Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a casecontrol study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 2004, 33:525-532.
49. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S: An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004, 40:304-313.
50. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, et al: The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004, 108:741-749.
51. Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P: Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 1997, 20:146-150.
52. Ng SK, Kabat GC, Wynder EL: Oral cavity cancer in non-users of tobacco. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:743-745.
53. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 1999, 35:375-378.
54. Boffetta P, Hashibe M: Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006, 7:149-156.
55. Wight AJ, Ogden GR: Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol* 1998, 34:441-447.
56. Ogden GR: Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 2005, 35:169- 173.
57. Vaca CE, Nilsson JA, Fang JL, Grafstrom RC: Formation of DNA adducts in human buccal epithelial cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro. *Chem Biol Interact* 1998, 108:197-208.
58. Leo MA, Lieber CS: Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr* 1999, 69:1071-1085.

59. Serpico R, Liguori G: *La candidosi orali: clinica, diagnosi e terapia*. Padova: Piccin Nuova Libreria; 2000.
60. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I: A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 84:111-112.
61. O'Grady JF, Reade PC: Candida albicans as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis* 1992, 13:783-786.
62. Field EA, Field JK, Martin MV: Does Candida have a role in oral epithelial neoplasia? *J Med Vet Mycol* 1989, 27:277-294.
63. Walker DM, Arendorf TM: Candidal leucoplakia, chronic multifocal candidosis and median rhomboid glossitis. . In *Oral candidosis*. Edited by Ltd BC. London: Samaranayake LP, Mac Farlane TW; 1990: 184-199
64. Miller CS, Johnstone BM: Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001, 91:622-635.
65. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J: Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991, 12:1627-1631.
66. Ostwald C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Loning T: Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994, 23:220- 225.
67. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF: Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998, 20:250-265.
68. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J: Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983, 12:418-424.
69. Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE, Stoner GD: Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 83:471-477.

70. Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C, Gandolfo S, Pentenero M, Carrozzo M, Serpico R, D'Angelo M: Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol* 2004, 40:835-840.
71. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavalda C, Poveda R, Scully C, Alberola TM, Torres-Puente M, Perez-Alonso M: Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, 65:46-49.
72. Shin KH, Min BM, Cherrick HM, Park NH: Combined effects of human papillomavirus-18 and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the transformation of normal human oral keratinocytes. *Mol Carcinog* 1994, 9:76-86.
73. Sugerman PB, Shillitoe EJ: The high risk human papilloma viruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997, 3:130-147.
74. Hermann RM, Fuzesi L, Pradier O, Christiansen H, Schmidberger H: Presence of human papillomavirus-18 and Epstein-Barr virus in a squamous cell carcinoma of the tongue in a 20-year-old patient. Case report and review of the current literature. *Cancer Radiother* 2004, 8:262-265.
75. Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, Meijer CJ: No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000, 86:356-361.
76. Jaber MA, Porter SR, Bain L, Scully C: Lack of association between hepatitis C virus and oral epithelial dysplasia in British patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003, 32:181-183.
77. Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Talamini R, Barbone F, Herrero R, Franceschi S: Diet and risk of oral and pharyngeal cancer. An Italian case-control study. *Eur J Cancer Prev* 2001, 10:191-195.
78. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikollajczak A, Zatonski W, Herrero R, Munoz N, Franceschi S: Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2003, 12:25-33.
79. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C: Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2000, 86:122-127.

80. De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H: Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-- II. Nutrients. *Oral Oncol* 1999, 35:22-26.
81. Franceschi S, Levi F, Conti E, Talamini R, Negri E, Dal Maso L, Boyle P, Decarli A, La Vecchia C: Energy intake and dietary pattern in cancer of the oral cavity and pharynx. *Cancer Causes Control* 1999, 10:439-444.
82. Franceschi S, Favero A, Conti E, Talamini R, Volpe R, Negri E, Barzan L, La Vecchia C: Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx. *Br J Cancer* 1999, 80:614-620.
83. Jessner W, Vogelsang H, Puspok A, Ferenci P, Gangl A, Novacek G, Bodisch A, Wenzl E: Plummer- Vinson syndrome associated with celiac disease and complicated by postcricoid carcinoma and carcinoma of the tongue. *Am J Gastroenterol* 2003, 98:1208-1209.
84. Greenberg MS, Glick M, Ship JA: *Burket's Oral medicine*. 11th edn. Hamilton: BC Decker; 2008.
85. Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, Munoz N, Franceschi S: Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer* 2000, 83:1238-1242.
86. Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP: Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998, 34:284-291.
87. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A, Ravichandran K, Ramdas K, Sankaranarayanan R, Gajalakshmi V, et al: Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 2002, 98:440-445.
88. Zheng TZ, Boyle P, Hu HF, Duan J, Jian PJ, Ma DQ, Shui LP, Niu SR, Scully C, MacMahon B: Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1990, 1:235-241.
89. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK: *Oral pathology - clinical pathological correlations*. 4th edn. St. Louis: Saunders; 2003.

90. Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, et al: Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1997, 336:897-904.
91. Demarosi F, Lodi G, Carrassi A, Soligo D, Sardella A: Oral malignancies following HSCT: graft versus host disease and other risk factors. *Oral Oncol* 2005, 41:865-877.
92. Hasegawa W, Pond GR, Rifkind JT, Messner HA, Lau A, Daly AS, Kiss TL, Kotchetkova N, Galal A, Lipton JH: Long-term followup of secondary malignancies in adults after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005, 35:51-55.
93. de Visscher JG, Bouwes Bavinck JN, van der Waal I: Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients. Report of six cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997, 26:120- 123.
94. van Zuuren EJ, de Visscher JG, Bouwes Bavinck JN: Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1998, 38:497-499.
95. Scheifele C, Reichart PA, Hippler- Benschmidt M, Neuhaus P, Neuhaus R: Incidence of oral, pharyngeal, and laryngeal squamous cell carcinomas among 1515 patients after liver transplantation. *Oral Oncol* 2005, 41:670-676.
96. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL: Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1995, 63:769- 773.
97. Mork J, Moller B, Glatte E: Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study. *Oral Oncol* 1999, 35:360-367.
98. Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, Winn DM, Bernstein L, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Jr.: Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994, 30B:319-322.
99. Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M: The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* 1999, 79:865-867.
100. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, 121:157-160.

101. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA: Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *Bmj* 1996, 313:716-721.
102. Bongers V, Braakhuis BJ, Tobi H, Lubsen H, Snow GB: The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, 5:595-598.
103. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953, 6:963-968.
104. Hoffman GR, Hayter JP: Widespread subcutaneous distant metastases from a head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002, 60:954-958.
105. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR: Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000, 110:397-401.
106. Connelly ST, Schmidt BL: Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Pain* 2004, 5:505-510.
107. Lip and oral cavity. In *AJCC cancer staging manual - sixth edition*. 6th edition. Edited by Green FG, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. New York: Springer Verlag; 2002: 23-32
108. Barthélémy I, Sannajust JP, Revol P, Mondié JM: Oral cancer. Preamble, epidemiology, clinical study. *EMC-Stomatologie* 2005, 1:277-294.
109. Ferlito A, Robbins KT, Medina JE, Shaha AR, Som PM, Rinaldo A: Is it time to eliminate confusion regarding cervical lymph node levels according to the scheme originated at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center? *Acta Otolaryngol* 2002, 122:805-807.
110. Woolgar JA: Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999, 37:175-180.
111. Sano H, Nitta M, Nakayama M, Yao K, Nagai H, Makoshi T, Inagi K, Takahashi H, Okamoto M: Clinical review of autopsy cases that succumbed to head and neck malignancies. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002:64-66.
112. Shah JP: *Cancer of the Head and Neck*. London: BC Decker Inc Hamilton; 2001.
113. Gnepp DR: *Diagnostic surgical pathology of the head and neck*. Philadelphia: W. B.Saunders Company; 2001.

114. Prince S, Bailey BM: Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999, 37:164-174.
115. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 3rd edn. New York: Mosby; 1999.
116. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT: Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998, 124:637- 640.
117. Bryne M, Jenssen N, Boysen M (1995). Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 427: 277-281.
118. Zidar N, Gale N, Kambic V, Fischinger J (2001). Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 21: 451-454.
119. Mallofre C, Cardesa A, Campo E, Condom E, Palacin A, Garin-Chesa P, Traserra J (1993). Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract* 189: 275-282.
120. van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ruiter DJ, Ramaekers CS, Kuijpers W (1997). Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 376-383.
121. Ghadially FN (1985). *Diagnostic Electron Microscopy of Tumours*. 2nd ed. Butterworths: London.
122. Groome PA, Schulze K, Boysen M, Hall SF, Mackillop WJ: A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* 2001, 23:613-624.
123. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer* 2009;115:3379-91.
124. Amit M, Na'ara S, Gil Z. 2016. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer*. 16(6):399–408.
125. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY. 2005. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment,

but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 29(2):167–178

126. Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. 2004. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97(4):423–431.

127. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. 2005. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med.* 129(3):354–359.

128. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stavrianos SD, Vilos GA, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncol* 2005;41:328–35.

129. Speight PM, Barrett AW. Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009;47:587–93.

130. Lowe JS, Anderson PG. 2014. Stevens & Lowe's human histology. 4th ed. Maryland Heights (MO): Mosby

131. Chi AC, Katabi N, Chen HS, Cheng YL. 2016. Interobserver variation among pathologists in evaluating perineural invasion for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 10(4):451–464.

132. Bockman DE, Buchler M, Beger HG. Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology* 1994;107:219–30.

133. Kayahara M, Nakagawara H, Kitagawa H, Ohta T. The nature of neural invasion by pancreatic cancer. *Pancreas* 2007;35:218–23.

134. Gil Z, Carlson DL, Gupta A, Lee N, Hoppe B, Shah JP, et al. Patterns and incidence of neural invasion in patients with cancers of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:173–9.

135. Chen W, Zhang HL, Shao XJ, Jiang YG, Zhao XG, Gao X, et al. Gene expression profile of salivary adenoid cystic carcinoma associated with perineural invasion. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:319–34.

136. Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, Di Bernardo C. 2004. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. *Oral Oncol.* 40(1):92–98.

137. Jardim JF, Francisco AL, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. 2015. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 44(1):23–28.
138. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. 2005. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med.* 129(3):354–359.
139. Shen WR, Wang YP, Chang JY, Yu SY, Chen HM, Chiang CP. 2014. Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 43(4):258–264.
140. L.B. Schmitd, C.S. Scanlon, and N.J. D'Silva (2018). Perineural Invasion in Head and Neck Cancer. *Journal of Dental Research* 2018, Vol. 97(7) 742 –750
141. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:637–40.
142. Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ, Barr L, Bliss JM, Shaw HJ. Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 1986;96:1145–8.
143. Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:423–31.
144. Tadbir AA, Ashraf MJ, Sardari Y. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2009;20:287–9.
145. Ross GL, Soutar DS, MacDonald DG, Shoaib T, Camilleri IG, Robertson AG. 2004. Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 11(2):213–218.
146. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. 2004. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 131(4):472–476.
147. Nair S, Singh B, Pawar PV, Datta S, Nair D, Kane S, Chaturvedi P. 2016. Squamous cell carcinoma of tongue and buccal mucosa: clinico-pathologically different entities. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 273(11):3921–3928

148. Miller ME, Palla B, Chen Q, Elashoff DA, Abemayor E, St John MA, Lai CK. 2012. A novel classification system for perineural invasion in noncutaneous head and neck squamous cell carcinoma: histologic subcategories and patient outcomes. *Am J Otolaryngol*. 33(2):212–215.
149. Carter RL, Tanner NS, Clifford P, Shaw HJ. Perineural spread in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathological study. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1979;4:271–81.
150. Caldemeyer KS, Mathews VP, Righi PD, Smith RR. Imaging features and clinical significance of perineural spread or extension of head and neck tumors. *Radiographics* 1998;18:97–110 [quiz 47].
151. Sullivan LM, Smee R. Leptomeningeal carcinomatosis from perineural invasion of a lip squamous cell carcinoma. *Australas Radiol* 2006;50:262–6.
152. Mendenhall WM, Amdur RJ, Williams LS, Mancuso AA, Stringer SP, Price Mendenhall N. Carcinoma of the skin of the head and neck with perineural invasion. *Head Neck* 2002;24:78–83.
153. Tarsitano A, Tardio ML, Marchetti C. 2015. Impact of perineural invasion as independent prognostic factor for local and regional failure in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 119(2):221–228.
154. Chinn SB, Spector ME, Bellile EL, McHugh JB, Gernon TJ, Bradford CR, Wolf GT, Eisbruch A, Chepeha DB. 2013. Impact of perineural invasion in the pathologically N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 149(6):893–899.
155. Tai SK, Li WY, Yang MH, Chu PY, Wang YF. 2013. Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection. *Am J Surg Pathol*. 37(8):1164–1172.
156. Bakst RL, Wong RJ. 2016. Mechanisms of perineural invasion. *J Neurol Surg B Skull Base*. 77(2):96–106.
157. Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, Shine D, Kadmon D, Thompson T, Miles BJ, et al. 2008. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 14(23):7593–7603.

158. Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. 2010. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(1):77–82.
159. Scanlon CS, Banerjee R, Inglehart RC, Liu M, Russo N, Hariharan A, van Tubergen EA, Corson SL, Asangani IA, Mistretta CM, et al. 2015. Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nat Commun.* 6:6885.
160. McLaughlin Jr RB, Montone KT, Wall SJ, Chalian AA, Weinstein GS, Roberts SA, et al. Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: a predictor of propensity toward perineural spread. *Laryngoscope* 1999;109:821–6.
161. Maruya SI, Myers JN, Weber RS, Rosenthal DI, Lotan R, El-Naggar AK. ICAM-5 (telencephalin) gene expression in head and neck squamous carcinoma tumorigenesis and perineural invasion. *Oral Oncol* 2005;41:580–8.
162. Kolokythas A, Cox DP, Dekker N, Schmidt BL. 2010. Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? *J Oral Maxillofac Surg.* 68(6):1290–1295.
163. Kowalski PJ, Paulino AF. 2002. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: its causation/promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol.* 33(9):933–936.
164. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, Feng L, Wang J, Holsinger FC, Yu D, et al. 2010. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 29(14):2047–2059.
165. Chuang JY, Tsai CF, Chang SW, Chiang IP, Huang SM, Lin HY, Yeh WL, Lu DY. 2013. Glial cell line–derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49(12):1103–1112.
166. Gao L, Bo H, Wang Y, Zhang J, Zhu M. 2015. Neurotrophic factor artemin promotes invasiveness and neurotrophic function of pancreatic adenocarcinoma in vivo and in vitro. *Pancreas.* 44(1):134–143.
167. Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7593–603.
168. Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model* 2010;7:37.

169. Ayala GE, Wheeler TM, Shine HD, Schmelz M, Frolov A, Chakraborty S, et al. In vitro dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction: redefining perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2001;49:213–23.
170. Binmadi NO, Yang YH, Zhou H, Proia P, Lin YL, De Paula AM, Guimaraes AL, Poswar FO, Sundararajan D, Basile JR. 2012. Plexin-B1 and semaphorin 4D cooperate to promote perineural invasion in a RhoA/ROK-dependent manner. *Am J Pathol.* 180(3):1232–1242.
171. Fuchikawa T, Nakamura F, Fukuda N, Takei K, Goshima Y. 2009. Protein tyrosine phosphatase SHP2 is involved in semaphorin 4D-induced axon repulsion. *Biochem Biophys Res Commun.* 385(1):6–10.
172. Lang R, Gundlach AL, Holmes FE, Hobson SA, Wynick D, Hokfelt T, Kofler B. 2015. Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev.* 67(1):118–175.
173. Henson BS, Neubig RR, Jang I, Ogawa T, Zhang Z, Carey TE, D'Silva NJ. 2005. Galanin receptor 1 has anti-proliferative effects in oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem.* 280(24):22564–22571.
174. Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. 2011. Rap1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal.* 23(7):1110–1118.
175. Chawla S, Warren TA, Wockner LF, Lambie DL, Brown IS, Martin TP, Khanna R, Leggatt GR, Panizza BJ. 2016. Galectin-1 is associated with poor prognosis in patients with cutaneous head and neck cancer with perineural spread. *Cancer Immunol Immunother.* 65(2):213–222.
176. Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, Lin YC, Ko TY, Lee YS, Tsai CL, et al. 2010. Overexpression of activin a in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol.* 17(7):1945–1956.
177. Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, Zhou Y, He S, McNamara WF, Chernichenko N, Lee SY, Barajas F, Chen CH, et al. 2016. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest.* 126(4):1538–1554.

178. Anderson TD, Feldman M, Weber RS, Ziober AF, Ziober BL. 2001. Tumor deposition of laminin-5 and the relationship with perineural invasion. *Laryngoscope*. 111(12):2140–2143.
179. Maruya SI, Myers JN, Weber RS, Rosenthal DI, Lotan R, El-Naggar AK. 2005. ICAM-5 (telencephalin) gene expression in head and neck squamous carcinoma tumorigenesis and perineural invasion! *Oral Oncol*. 41(6):580–588.
180. Sappayatosok K, Phattaratatip E. 2015. Overexpression of claudin-1 is associated with advanced clinical stage and invasive pathologic characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 9(2):173–180
181. Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordonez B, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. 2008. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 113(11):3169–3180.
182. Tarsitano A, Asioli S, Morandi L, Monti V, Righi A, Morselli Labate AM, Nardi E, Foschini MP, Marchetti C. 2016. Laminin-5 and insulin-like growth factor-II mRNA binding protein-3 (IMP3) expression in preoperative biopsy specimens from oral cancer patients: their role in neural spread risk and survival stratification. *J Craniomaxillofac Surg*. 44(12):1896–1902.
183. Coutinho-Camillo CM, Lourenco SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. 2010. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 57(2):304–316.
184. William G. Albergotti, MD; William E. Gooding, MS; Mark W. Kubik, MD; Mathew Geltzeiler, MD; Seungwon Kim, MD; Umamaheswar Duvvuri, MD, PhD; Robert L. Ferris, MD, PhD. Assessment of Surgical Learning Curves in Transoral Robotic Surgery for Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017;143(6):542-548. doi:10.1001/jamaoto.2016.4132
185. Patrick Tassone, MD1 , Meghan Crawley, MD1 , Cory Bovenzi, MD1 , Tingting Zhan, PhD2 , William Keane, MD1 , David Cognetti, MD1 , Adam Luginbuhl, MD1 , and Joseph Curry, MD. Pathologic Markers in Surgically Treated HPV-Associated Oropharyngeal Cancer: Retrospective Study, Systematic Review, and Meta-analysis. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 2017, Vol. 126(5) 365–374

186. L.B. Schmitz¹, C.S. Scanlon¹, and N.J. D'Silva. Perineural Invasion in Head and Neck Cancer. *Journal of Dental Research* 2018, Vol. 97(7) 742 –750
187. Edge, S.B. and American Joint Committee on Cancer., AJCC cancer staging manual. 7th ed. 2010, New York: Springer. xiv, 648 p.
188. 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.
189. 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.
190. González-García R, Naval-Gías L, Román-Romero L, Sastre-Pérez J, Rodríguez-Campo FJ. 2009. Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients. *Head Neck*. 31(9):1168–1180.
191. Aivazian K, Ebrahimi A, Low TH, Gao K, Clifford A, Shannon K, Clark JR, Gupta R. 2015. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: quantitative subcategorisation of perineural invasion and prognostication. *J Surg Oncol*. 111(3):352–358.
192. Barrett AW, Speight PM. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a valid prognostic indicator? *Oral Oncol* 2009;45:936–40.
193. Barrett AW, Speight PM. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: anatomical influences on oncological management. *Curr Cancer Ther Rev* 2011;7:78–82.
194. Eneroth CM. Facial nerve paralysis. A criterion of malignancy in parotid tumors. *Arch Otolaryngol* 1972;95:300–4.
195. Min KW, Houck Jr JR. Protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinomas of the upper aerodigestive tract: carcinomas of the oral cavity including lip and tongue, nasal and paranasal sinuses, pharynx, larynx, salivary glands, hypopharynx, oropharynx, and nasopharynx. Cancer Committee, College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:222–30.
196. Wallwork BD, Anderson SR, Coman WB. Squamous cell carcinoma of the floor of the mouth: tumour thickness and the rate of cervical metastasis. *ANZ J Surg* 2007;77:761–4.

197. McMahon JD, Robertson GA, Liew C, McManners J, Mackenzie FR, Hislop WS, et al. Oral and oropharyngeal cancer in the West of Scotland-long-term outcome data of a prospective audit 1999–2001. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2011;49:92–8.
198. Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;38:657–62.
199. D'Cruz AK, Siddachari RC, Walvekar RR, Pantvaidya GH, Chaukar DA, Deshpande MS, et al. Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. *Head Neck* 2009;31:618–24.
200. An SY, Jung EJ, Lee M, Kwon TK, Sung MW, Jeon YK, et al. Factors related to regional recurrence in early stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1:166–70.
201. Sethi S, Lu M, Kapke A, Benninger MS, Worsham MJ. Patient and tumor factors at diagnosis in a multi-ethnic primary head and neck squamous cell carcinoma cohort. *J Surg Oncol* 2009;99:104–8.
202. Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol* 2010;35:307–12.
203. Chun-Ta Liao, Joseph Tung-Chieh Chang, Hung-Ming Wang, Shu-Hang Ng, Chuen Hsueh, Li-Yu Lee, Chih-Hung Lin, I-How Chen, Shiang-Fu Huang, Ann-Joy Cheng, Lai-Chu See, Tzu-Chen Yen. Does Adjuvant Radiation Therapy Improve Outcomes in pT1-3N0 Oral Cavity Cancer With Tumor-Free Margins and Perineural Invasion? clinical investigation | volume 71, issue 2, p371-376, june 01, 2008
204. Chen, T., Wang, C., Ko, J. et al. The Impact of Perineural Invasion and/or Lymphovascular Invasion on the Survival of Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* 20, 2388–2395 (2013). <https://doi.org/10.1245/s10434-013-2870-4>.