



PhD Course

“Medicina Clinica e Sperimentale”
XXVIII Cicle

Titolo specifico del Programma di Ricerca

*Ricerca di marcatori molecolari del carcinoma del cavo orale
nei fluidi biologici, quali sangue e saliva,
a fini di diagnosi precoce e prognosi.*

Coordinatore

Prof. Lorenzo Lo Muzio

Tutor

Prof. Lorenzo Lo Muzio

Dottorando

Dott. Giovanni Giannatempo

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Il carcinoma del cavo orale | 1 |
| 1.1 Epidemiologia | 1 |
| 1.2 Eziologia | 4 |
| 1.2.1 Agenti fisico-chimici..... | 4 |
| 1.2.2 Microrganismi | 7 |
| 1.2.3 Aspetti nutrizionali..... | 8 |
| 1.2.4 Alterazioni e carenze immunitarie | 8 |
| 1.2.5 Irritazioni e infiammazioni croniche..... | 9 |
| 1.2.6 Scarsa igiene orale..... | 9 |
| 1.2.7 Condizioni ambientali e predisposizione genetica | 9 |
| 1.2.8 Disordini potenzialmente maligni | 9 |
| 1.3 Patogenesi..... | 10 |
| 1.4 Aspetti clinici..... | 16 |
| 1.5 Diagnosi | 20 |
| 1.6 Istopatologia | 22 |
| 1.7 Stadiazione clinica | 23 |
| 1.8 Prognosi | 25 |
| 1.9 Terapia..... | 25 |
| 1.9.1 Chirurgia | 26 |
| 1.9.2 Radioterapia | 28 |
| 1.9.3 Chemioterapia | 29 |
| 1.9.4 Terapia combinata..... | 29 |
| 2. Saliva nuova matrice non invasiva utilizzata come fluido biologico | 31 |
| 2.1 La saliva: composizione | 31 |
| 2.2 La saliva come mezzo diagnostico di patologie sistemiche | 38 |
| 2.3 La saliva e le neoplasie non orali..... | 42 |
| 2.4 La saliva ed il cancro orale | 43 |
| 3. Individuazione di nuovi marcatori..... | 44 |
| 3.1 La survivina | 44 |
| 3.2 Seldi..... | 47 |
| 4. Scopo dello studio..... | 51 |
| 5. Materiali e metodi..... | 52 |
| 5.1 Reclutamento dei pazienti..... | 52 |
| 5.2 Raccolta campione saliva | 54 |
| 5.3 Analisi proteomica SELDI-TOF | 55 |
| 5.4 Analisi della survivina | 57 |
| 6. Risultati..... | 59 |
| 7. Discussione..... | 71 |
| 7.1 Prospettive future | 75 |
| Bibliografia | 77 |

1. Il carcinoma del cavo orale

Il carcinoma a cellule squamose è il più frequente tumore maligno del cavo orale [1, 2]. È all'ottavo posto tra le neoplasie maligne più comuni ed è caratterizzato da un basso tasso di sopravvivenza, principalmente a causa dello stadio avanzato al momento della diagnosi ed alla alta frequenza di recidive e/o metastasi. Dopo il trattamento iniziale chirurgico e/o radioterapico, le recidive o le metastasi ricorrono in più del 50% dei pazienti (l'80% dei casi entro i 2 anni) e ad oggi la sopravvivenza complessiva a 5 anni dei pazienti con OSCC è inferiore al 50%. Se l'OSCC è diagnosticato in uno stadio iniziale, la sopravvivenza a 5 anni sale all'80-90% ed i costi delle prestazioni terapeutiche sono significativamente ridotti. Purtroppo a tutt'oggi nella maggioranza dei casi la diagnosi è effettuata in fase avanzata. Meno frequenti sono il carcinoma verrucoso, che rappresenta circa il 3% dei carcinomi orali, il carcinoma a cellule fusate e il carcinoma a cellule basali [3]

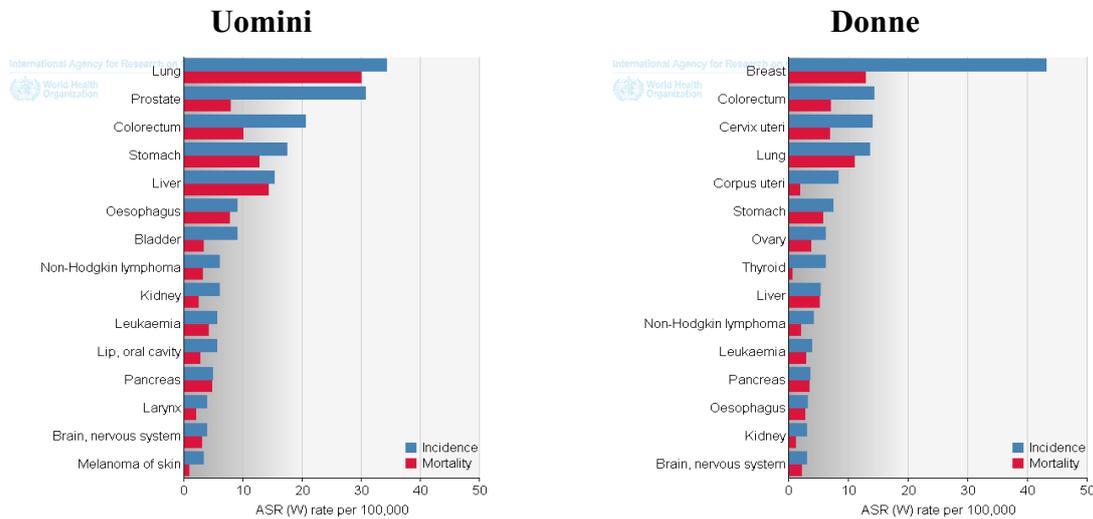
1.1 Epidemiologia

Nel mondo, le zone a più alta incidenza di tumori del cavo orale sono l'America del Sud (in particolare il Brasile), l'America del Nord, il continente asiatico (soprattutto l'India e l'Indonesia), la Somalia, l'Etiopia e il Madagascar[4]. Il carcinoma orale è più frequente nell'uomo che nella donna, con un rapporto M:F = 2:1. (Tabella 1)

Il carcinoma squamocellulare rappresenta l'1-2% di tutte le cause di morte per cancro.[5]La sopravvivenza a 5 anni è bassa, attestandosi al 50%, senza mostrare miglioramenti rispetto ai dati degli ultimi 50 anni. Analizzando la situazione in Italia per i tumori del distretto testa-collo (ICD-10 C00-14, C30-32) la prevalenza è di 200/100.000 abitanti: in particolare per gli uomini 326/100.000 e per le donne 82/100.000. Nello specifico, per il tumore della cavità orale la prevalenza per gli uomini è di 27/100.000 e per le donne di 14/100.000. Il tumore delle

ghiandole salivari, invece, ha una maggiore prevalenza nelle donne. Il tumore della lingua è più frequente nell'uomo, con una prevalenza di 17/100.000.

Tabella 1 Aree nel mondo con più alta incidenza di tumori del cavo orale



Globocan 2012

Per quanto riguarda la distribuzione dei tumori del distretto testa-collo nel nostro Paese, c'è una maggiore prevalenza nel nord-est, seguita dal nord-ovest, centro e infine sud e isole.

Tabella 2.1 Uomini: stima dell'incidenza, della mortalità e della prevalenza in 5 anni

| Cancer | Incidence | | | Mortality | | | 5-year prevalence | | |
|--|-----------|-------|---------|-----------|-------|---------|-------------------|-------|--------|
| | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | Prop. |
| Lip, oral cavity | 2283 | 1.2 | 4.1 | 960 | 1.0 | 1.5 | 6610 | 1.3 | 26.0 |
| Nasopharynx | 315 | 0.2 | 0.7 | 133 | 0.1 | 0.3 | 952 | 0.2 | 3.8 |
| Other pharynx | 1241 | 0.6 | 2.4 | 764 | 0.8 | 1.4 | 3223 | 0.6 | 12.7 |
| Oesophagus | 1337 | 0.7 | 2.1 | 1308 | 1.4 | 2.0 | 1535 | 0.3 | 6.0 |
| Stomach | 7549 | 3.9 | 10.9 | 5723 | 6.0 | 7.6 | 13545 | 2.6 | 53.3 |
| Colorectum | 26568 | 13.8 | 41.5 | 10253 | 10.8 | 13.5 | 77340 | 14.9 | 304.4 |
| Liver | 7188 | 3.7 | 11.0 | 6010 | 6.3 | 8.3 | 8051 | 1.5 | 31.7 |
| Gallbladder | 1666 | 0.9 | 2.3 | 1395 | 1.5 | 1.8 | 1619 | 0.3 | 6.4 |
| Pancreas | 4946 | 2.6 | 7.5 | 5074 | 5.3 | 7.5 | 3051 | 0.6 | 12.0 |
| Larynx | 3714 | 1.9 | 6.3 | 1502 | 1.6 | 2.2 | 13560 | 2.6 | 53.4 |
| Lung | 26931 | 14.0 | 38.5 | 24686 | 26.0 | 33.6 | 31743 | 6.1 | 124.9 |
| Melanoma of skin | 4888 | 2.5 | 11.1 | 1070 | 1.1 | 1.8 | 19722 | 3.8 | 77.6 |
| Kaposi sarcoma | 560 | 0.3 | 1.0 | 69 | 0.1 | 0.1 | 1630 | 0.3 | 6.4 |
| Prostate | 44525 | 23.2 | 67.6 | 7814 | 8.2 | 7.9 | 167886 | 32.3 | 660.8 |
| Testis | 2664 | 1.4 | 8.7 | 82 | 0.1 | 0.2 | 10627 | 2.0 | 41.8 |
| Kidney | 7681 | 4.0 | 13.1 | 2803 | 3.0 | 3.8 | 24424 | 4.7 | 96.1 |
| Bladder | 14674 | 7.6 | 21.2 | 4547 | 4.8 | 5.1 | 52424 | 10.1 | 206.3 |
| Brain, nervous system | 2762 | 1.4 | 5.9 | 2261 | 2.4 | 4.3 | 3016 | 0.6 | 11.9 |
| Thyroid | 2648 | 1.4 | 6.7 | 234 | 0.2 | 0.3 | 10795 | 2.1 | 42.5 |
| Hodgkin lymphoma | 919 | 0.5 | 2.8 | 258 | 0.3 | 0.5 | 3347 | 0.6 | 13.2 |
| Non-Hodgkin lymphoma | 6951 | 3.6 | 13.9 | 2611 | 2.7 | 3.8 | 19994 | 3.8 | 78.7 |
| Multiple myeloma | 2775 | 1.4 | 4.4 | 1570 | 1.7 | 2.0 | 7229 | 1.4 | 28.5 |
| Leukaemia | 4902 | 2.6 | 9.5 | 3532 | 3.7 | 5.0 | 10667 | 2.1 | 42.0 |
| All cancers excl. non-melanoma skin cancer | 192151 | 100.0 | 312.9 | 94986 | 100.0 | 128.6 | 520303 | 100.0 | 2047.9 |

Incidence and mortality data for all ages. 5-year prevalence for adult population only. ASR (W) and proportions per 100,000.

Globocan 2012

In tutta Italia (al 2012) la prevalenza totale del tumore della regione testa-collo era di 84.000 uomini (Tabella 2.1) e 22.000 donne (Tabella 2.2).

Tabella 2.2 Donne: stima dell'incidenza, della mortalità e della prevalenza in 5 anni

| Cancer | Incidence | | | Mortality | | | 5-year prevalence | | |
|--|-----------|-------|---------|-----------|-------|---------|-------------------|-------|--------|
| | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | Prop. |
| Lip, oral cavity | 1524 | 0.9 | 2.1 | 589 | 0.8 | 0.6 | 4155 | 0.8 | 15.4 |
| Nasopharynx | 124 | 0.1 | 0.3 | 57 | 0.1 | 0.1 | 364 | 0.1 | 1.4 |
| Other pharynx | 348 | 0.2 | 0.6 | 196 | 0.3 | 0.3 | 889 | 0.2 | 3.3 |
| Oesophagus | 472 | 0.3 | 0.5 | 438 | 0.6 | 0.5 | 514 | 0.1 | 1.9 |
| Stomach | 5452 | 3.4 | 5.9 | 4194 | 5.6 | 3.9 | 9601 | 2.0 | 35.6 |
| Colorectum | 21542 | 13.3 | 27.5 | 9026 | 12.0 | 8.6 | 62438 | 12.7 | 231.6 |
| Liver | 3545 | 2.2 | 3.6 | 3188 | 4.2 | 2.8 | 3813 | 0.8 | 14.1 |
| Gallbladder | 2279 | 1.4 | 2.3 | 1969 | 2.6 | 1.8 | 2204 | 0.4 | 8.2 |
| Pancreas | 5742 | 3.5 | 5.9 | 5563 | 7.4 | 5.4 | 3363 | 0.7 | 12.5 |
| Larynx | 335 | 0.2 | 0.5 | 149 | 0.2 | 0.2 | 1216 | 0.2 | 4.5 |
| Lung | 10307 | 6.4 | 13.2 | 8845 | 11.8 | 10.4 | 12217 | 2.5 | 45.3 |
| Melanoma of skin | 5124 | 3.2 | 11.7 | 737 | 1.0 | 1.1 | 20526 | 4.2 | 76.2 |
| Kaposi sarcoma | 217 | 0.1 | 0.2 | 39 | 0.1 | 0.0 | 629 | 0.1 | 2.3 |
| Breast | 50658 | 31.2 | 91.3 | 12796 | 17.1 | 15.8 | 209048 | 42.5 | 775.6 |
| Cervix uteri | 2918 | 1.8 | 6.7 | 1016 | 1.4 | 1.5 | 10558 | 2.1 | 39.2 |
| Corpus uteri | 8471 | 5.2 | 14.0 | 1955 | 2.6 | 2.1 | 32447 | 6.6 | 120.4 |
| Ovary | 5911 | 3.6 | 10.2 | 3617 | 4.8 | 4.7 | 14495 | 2.9 | 53.8 |
| Kidney | 3619 | 2.2 | 4.9 | 1400 | 1.9 | 1.4 | 11203 | 2.3 | 41.6 |
| Bladder | 3610 | 2.2 | 3.9 | 1198 | 1.6 | 0.9 | 12729 | 2.6 | 47.2 |
| Brain, nervous system | 2166 | 1.3 | 4.0 | 1741 | 2.3 | 2.7 | 2092 | 0.4 | 7.8 |
| Thyroid | 6811 | 4.2 | 14.7 | 356 | 0.5 | 0.3 | 28287 | 5.7 | 104.9 |
| Hodgkin lymphoma | 665 | 0.4 | 2.0 | 164 | 0.2 | 0.3 | 2083 | 0.4 | 7.7 |
| Non-Hodgkin lymphoma | 5597 | 3.4 | 8.6 | 2157 | 2.9 | 2.1 | 14998 | 3.0 | 55.6 |
| Multiple myeloma | 2587 | 1.6 | 3.3 | 1624 | 2.2 | 1.5 | 6677 | 1.4 | 24.8 |
| Leukaemia | 3467 | 2.1 | 6.1 | 2653 | 3.5 | 3.0 | 7271 | 1.5 | 27.0 |
| All cancers excl. non-melanoma skin cancer | 162305 | 100.0 | 255.2 | 75044 | 100.0 | 81.3 | 492238 | 100.0 | 1826.2 |

Incidence and mortality data for all ages. 5-year prevalence for adult population only. ASR (W) and proportions per 100,000.

Globocan 2012

In generale, quindi, possiamo affermare che gli uomini sono più colpiti delle donne, verosimilmente per un'esposizione maggiore ai fattori di rischio (alcol, tabacco, HPV); tuttavia, negli ultimi decenni gli uomini hanno presentato un trend in riduzione sia per incidenza che per mortalità, mentre nelle donne è stato registrato un incremento dell'incidenza, probabilmente per un livellamento nell'esposizione ai fattori di rischio nei due sessi, e un andamento stabile della mortalità.

La prevalenza dei tumori del distretto testa-collo, inoltre, aumenta in modo progressivo con l'aumentare dell'età; tuttavia, sono in aumento le diagnosi in pazienti con meno di 45 anni, probabilmente per una correlazione con infezioni da HPV.

1.2 Eziologia

Di seguito sono riportati i principali fattori di rischio correlati allo sviluppo del carcinoma squamocellulare orale[6-8].

1.2.1 Agenti fisico-chimici

Tabacco

Il consumo di tabacco, sia fumato che masticato, rappresenta uno dei principali fattori di rischio nello sviluppo del carcinoma squamocellulare orale. In Europa, America e Giappone circa l'80% dei pazienti con carcinoma orale ha un'anamnesi positiva per



Figura 1

l'utilizzo di sigarette e/o alcool. Esiste una marcata relazione dose-risposta, pertanto il rischio di sviluppare un tumore è correlato al numero di sigarette consumate al giorno e alla durata del tabagismo[9, 10]. Gli effetti carcinogenetici del tabacco sono riferibili ad alcuni dei suoi componenti, quali le nitrosamine, l'acetaldeide e i benzopireni, tra cui il BPDE. Questi composti carcinogeni agiscono su due livelli: da una parte, creando un danno ossidativo al DNA, determinando un iniziale insulto genetico e inducendo un effetto mutageno a carico di oncogeni e geni oncosoppressori, dall'altra provocando un danno mucoso cronico che rappresenta un continuo stimolo proliferativo. Il tabacco fumato, oltre a rappresentare un insulto chimico per la presenza dei carcinogeni descritti, provoca anche un insulto termico. In particolare, il fumo di pipa e sigaro è spesso correlato al carcinoma del labbro, in quanto, si instaura un sinergismo tra gli effetti carcinogenetici del tabacco e un traumatismo termico cronico, dovuto all'abitudine di tenere appoggiato il sigaro o il cannello della pipa sullo stesso punto.

Un altro esempio di traumatismo chimico e termico dovuto ad un diverso consumo del tabacco

è quello causato dal reverse smoking[11], che consiste nel posizionare la sigaretta nel verso contrario, cioè con il punto di combustione all'interno del cavo orale, con la conseguenza di gravi ustioni del palato che possono andare incontro a trasformazione maligna. Il reverse smoking è comunemente praticato in India, ma era usanza anche di alcuni soldati durante la prima guerra mondiale a causa della necessità di fumare di nascosto; sembra che questa abitudine fosse diffusa anche tra alcuni pastori del bacino del Mediterraneo, che sfruttavano il calore della combustione per riscaldarsi.

Il tabacco masticato provoca effetti tossici locali ed è spesso associato a leucoplachie del fornice, lesioni reattive ipercheratosiche che nel tempo possono avere un'evoluzione maligna[12].

Betel o Paan quid

In Paesi come India, Pakistan[13], Taiwan e in alcune regioni della Cina la masticazione del tabacco mescolato con foglie di Betel, noce di areca e idrossido di calcio (lime) causa circa il 50% dei carcinomi orali nell'uomo e circa il 90% nella donna.



Figura 2

Questa patologia rientra nell'ambito dei disordini potenzialmente maligni, infatti circa il 15% di questi soggetti sviluppa successivamente atipie cellulari, mentre nel 7% dei casi si verifica l'insorgenza del carcinoma squamocellulare.

Alcool

L'etanolo è assorbito dall'intestino tenue e poi metabolizzato dal fegato ad opera dell'enzima Alcool Deidrogenasi (ADH), che lo trasforma in acetaldeide, un composto carcinogeno.



Figura 3

Successivamente, ad opera delle aldeide deidrogenasi (ALDH), l'acetaldeide viene trasformata in acido carbossilico, non carcinogeno. Un polimorfismo genetico che causa la sintesi di ADH mutato comporta la riduzione della trasformazione dell'etanolo in acetaldeide e questo, può rappresentare un sistema di protezione per l'organismo; al contrario, un polimorfismo genetico che causa la sintesi di ALDH mutato comporta un accumulo di acetaldeide; in questi casi viene a mancare un importante sistema di protezione che può predisporre il soggetto allo sviluppo del carcinoma.

Alcool e tabacco hanno un effetto co-carcinogenetico[14]: il consumo associato di queste sostanze moltiplica di circa 40 volte il rischio di sviluppare un carcinoma orale[15, 16]. L'alcool agisce sulla mucosa orale come irritante o come solvente per sostanze carcinogene, soprattutto quelle derivanti dal tabacco[17].



Figura 4

Tale associazione aumenta, inoltre, anche il rischio di sviluppare un secondo tumore primitivo secondo il concetto di cancerizzazione di campo: l'insulto provocato da questi carcinogeni non è circoscritto alla sola zona dove si è sviluppato clinicamente il tumore, ma può aver prodotto alterazioni molecolari e tissutali su tutta la mucosa esposta, predisponendola allo sviluppo di recidive o di secondi tumori primitivi[18, 19].

Raggi ultravioletti

L'esposizione ai raggi ultravioletti, UVA e, in maggior misura, UVB, rappresenta il fattore di rischio principale per lo sviluppo di carcinomi squamocellulari del labbro inferiore. L'eccessiva esposizione ai raggi solari,



Figura 5

soprattutto a causa di pregresse ustioni acute, ma anche in caso di esposizione cronica nell'ambito di alcune categorie lavorative (marinai, contadini), e con una maggiore predisposizione nei soggetti di carnagione chiara, può comportare lo sviluppo della cheilite attinica, un disordine potenzialmente maligno a carico del vermiglio del labbro avente potenziale di trasformazione maligna.

1.2.2 Microrganismi

Candida Albicans

La *Candida Albicans* è un micete saprofito commensale della cavità orale, presente nel 25-50% della popolazione sana. Tuttavia, in determinate condizioni dell'ospite (temperatura, umidità, difese immunitarie, condizioni igieniche orali) e in relazione a caratteristiche



Figura 6

patogenetiche proprie del micete (specie, capacità di adesione, etc.), può organizzarsi in ife filamentose e manifestare un comportamento patogeno[20]. A causa della produzione della nitrosobenzilmetilamina, un metabolita carcinogeno, può essere responsabile di una particolare forma di leucoplachia, la leucoplachia ipertrofica candidosica o micosi leucoplasica. Si tratta di una forma che generalmente si manifesta nella zona retrocommissurale, con un aspetto a placca, piuttosto piano e regolare, in genere con comportamento benigno, o con un aspetto nodulare, più disomogeneo e caratterizzato da una crescita esofitica, che più frequentemente è associato a trasformazione maligna. A differenza delle altre forme di leucoplachia, questa lesione risponde positivamente alla terapia antimicotica.

HPV16, 18, 31 e 33 (HumanPapillomaVirus)

Il coinvolgimento dell'HPV nella carcinogenesi orale e orofaringea fu ipotizzato per la prima

volta nel 1983 da Syrjanen et al.[21] e poi confermato da altri autori sulla base delle seguenti evidenze: (1) il ben documentato tropismo epiteliale dell'HPV[22, 23], (2) l'istologia simile tra gli epitelii orofaringeo e genitale, (3) il ruolo di HPV nel determinismo del carcinoma cervicale, (4) la presenza di genoma virale HR-HPV in preparati di carcinoma squamocellulare umano. L'HPV è coinvolto nell'oncogenesi in quanto sintetizza le proteine E6 ed E7, che inibiscono l'azione di due oncosoppressori, la proteina del retinoblastoma (pRb) e la p53, producendo un vantaggio proliferativo nelle cellule infette. Il paziente a rischio per questo tipo di tumore è generalmente maschio, single, di età inferiore ai 40/45 anni. Di solito è un tipo di tumore ben differenziato che risponde bene a radioterapia e chemioterapia e agli immunomodulatori, con ottimi risultati clinici in termini di sopravvivenza.

1.2.3 Aspetti nutrizionali

Iposideremia

In particolare, tra le forme di iposideremia, la sindrome di Plummer-Vinson (PVS) o di Patterson-Kelly è considerata una condizione precancerosa[24-26]. La PVS si caratterizza per una triade clinica comprendente disfagia, anemia sideropenica e glossite con una predisposizione allo sviluppo di carcinomi squamocellulari orali.



Figura 7

1.2.4 Alterazioni e carenze immunitarie

Un sistema immunitario compromesso costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro orale, così come di malattie linfoproliferative. Questo incremento è stato documentato per i soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo e di rene, che sono iatrogenicamente immunosoppressi. L'irradiazione sub-totale e le alte dosi di chemioterapici che vengono

impiegati nella fase di condizionamento, espongono il paziente al rischio di sviluppare neoplasie solide e linfatiche.

1.2.5 Irritazioni e infiammazioni croniche

Si ritiene che fenomeni di irritazione cronica rappresentino dei promotori piuttosto che degli iniziatori di un processo neoplastico orale. Il trauma meccanico legato a protesi incongrue, a otturazioni fratturate o a cuspidi taglienti non sembra in grado di provocare il cancro orale. Tuttavia, se la neoplasia è indotta da un'altra causa,



Figura 8

la contemporanea presenza di un fattore irritativo può renderne più rapido lo sviluppo.

1.2.6 Scarsa igiene orale

L'accumulo di placca e tartaro determina l'instaurarsi di condizioni infiammatorie delle mucose, rappresentando un fattore predisponente/coadiuvante la carcinogenesi[27].

1.2.7 Condizioni ambientali e predisposizione genetica

Le alterazioni genetiche sono determinanti nello sviluppo dell'oncogenesi, soprattutto in relazione alla possibile presenza di polimorfismi genetici ereditari.

1.2.8 Disordini potenzialmente maligni

I disordini potenzialmente maligni della mucosa orale, precedentemente noti come "precancerosi", sono alterazioni morfologiche della mucosa riferibili o ad espressioni locali di malattie generali, o a reazioni localizzate dovute a fattori irritativi cronici, o a cause ignote, e che hanno probabilità di degenerare superiore a quella della mucosa orale circostante. Tra i disordini potenzialmente maligni, il più frequente, è la leucoplachia; meno frequenti sono

l'eritroplachia, la cheilite attinica, la fibrosi sottomucosa, il lichen planus, la lesione del palato da reverse smoking, il lupus eritematoso discoide, i disordini ereditari con aumentato rischio di carcinoma orale[28]

1.3 Patogenesi

In condizioni fisiologiche, la crescita tissutale è il risultato di un delicato equilibrio tra fattori che promuovono e fattori che inibiscono la replicazione cellulare, attraverso un complesso meccanismo di controllo che governa l'omeostasi tissutale. La cellula neoplastica è capace di sfuggire a questi meccanismi di controllo, acquisendo un programma autoctono di replicazione; tale programma è il risultato di polimorfismi genetici. Per polimorfismo genetico si intende una variazione genetica con una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione. La variazione genetica può essere determinata da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti (esoni) e regioni non codificanti (introni): se viene modificata una regione codificante, o viene modificata la funzione del gene o esso viene inattivato.

Il cancro orale, come la maggior parte delle neoplasie maligne, insorge in seguito all'accumulo di un certo numero di polimorfismi a carico di geni che codificano per proteine adibite al controllo del ciclo cellulare, della sopravvivenza cellulare, della mobilità, dell'angiogenesi, dell'infiammazione e di specifici sistemi enzimatici. Secondo un processo di "evoluzione clonale", ciascuna mutazione genetica può conferire una predisposizione di tipo proliferativo, permettendo un'espansione clonale delle cellule mutate con aumentato potenziale di malignità. È stato dimostrato che è sufficiente un piccolo numero di mutazioni genetiche per assumere caratteristiche di malignità. Per esempio, le mutazioni dei geni APC e K-ras si evidenziano precocemente nella progressione tumorale, mentre le alterazioni della p53 e del DCC si riscontrano più spesso nei tumori in fase avanzata.

Il cancro orale progredisce attraverso due importanti stadi biologici: la perdita del controllo del ciclo cellulare, con aumentata proliferazione cellulare e diminuzione dell'apoptosi, e l'aumento della motilità cellulare che comporta invasività e capacità di dare metastasi (Figura 9).

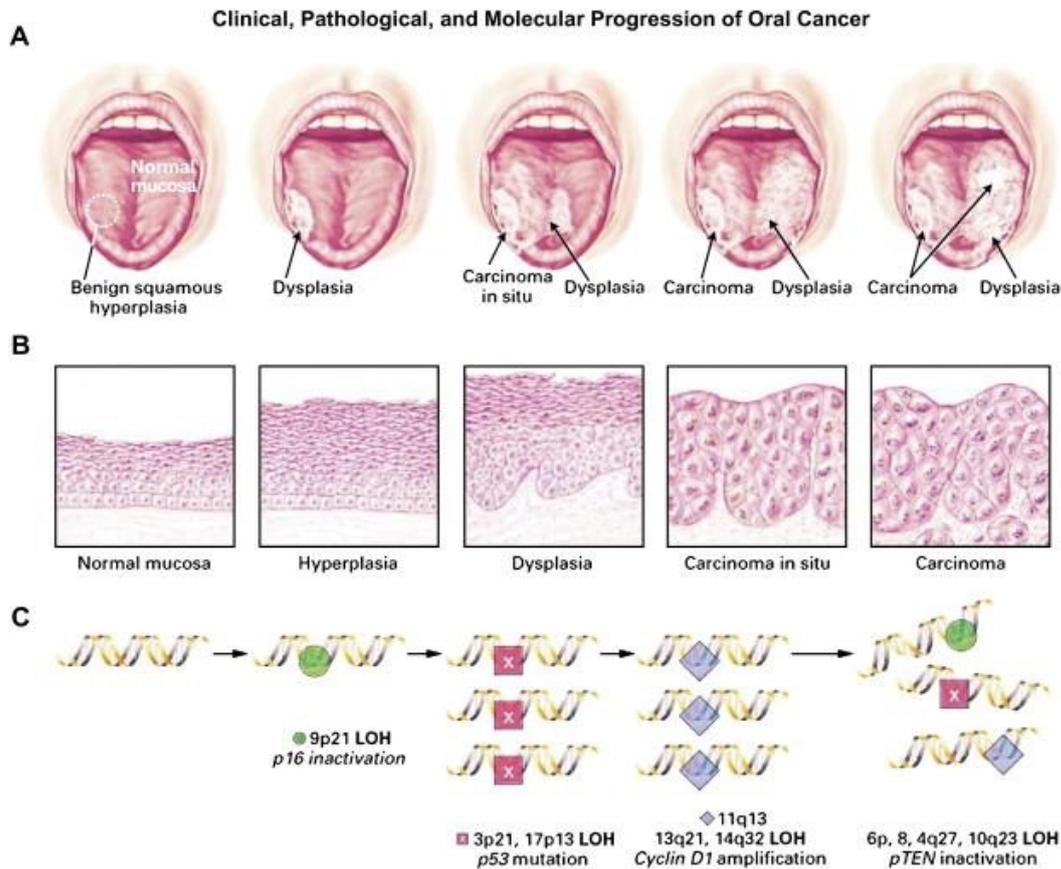


Figura 9 Patogenesi del carcinoma squamocellulare orale. Livello clinico (A); Livello istopatologico (B); Livello molecolare (C).

Questi meccanismi patogenetici sottendono alterazioni genetiche che prevedono l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di geni oncosoppressori.

Gli oncogeni codificano per proteine coinvolte nella regolazione positiva della crescita cellulare, controllandone la proliferazione, l'apoptosi, la mobilità, le comunicazioni intracellulari e l'angiogenesi. Se questi geni vengono alterati tramite mutazioni, si ottiene un'iper-espressione della proteina codificata con conseguente formazione di un clone di cellule con vantaggi proliferativi e di mobilità. I geni oncosoppressori codificano per proteine che

regolano negativamente o sopprimono la proliferazione cellulare. La mutazione di questi geni, che richiede cambiamenti sia nell'allele materno che in quello paterno, sopprime l'inibizione della proliferazione di un clone di cellule.

Nel cancro orale, si crede abbiano un ruolo più importante le mutazioni a carico di geni oncosoppressori rispetto alle mutazioni degli oncogeni. Le mutazioni dei geni che controllano il ciclo cellulare sembrano essere di importanza critica per lo sviluppo del cancro orale. La divisione cellulare si costituisce di quattro fasi: G1 (gap 1), S (sintesi di DNA), G2 (gap 2) e M (mitosi). La progressione dalla fase G1 alla fase S è regolata da un sistema complesso di interazioni proteiche. Mutazioni genetiche, se non riparate nella fase G1, possono essere trasportate attraverso la fase S e quindi perpetuate nella conseguente divisione cellulare.

L'up-regolazione di oncogeni o la down-regolazione di geni oncosoppressori, può spostare l'equilibrio in favore della proliferazione e della trasformazione neoplastica.

Il gene p53 è un gene oncosoppressore ed è un regolatore chiave negativo della fase G1-S del ciclo cellulare. In circa il 50% dei carcinomi orali il gene p53 è mutato e la proteina per cui codifica non è attiva. Un difetto della proteina p53 permette alle cellule di procedere nella fase S del ciclo cellulare senza che il DNA alterato possa essere riparato. Il risultato è un accumulo di difetti genetici deleteri che contribuiscono alla trasformazione maligna. Questa proteina può essere già alterata nelle lesioni orali precancerose e potrebbe essere un indicatore per identificare le lesioni ad alto rischio. La proteina MDM2 media la degradazione della p53, ed è frequentemente iper-espressa nel carcinoma orale.

L'iper-espressione della proteina ciclina D1 può essere identificata in molti carcinomi orali e determina un aumento della proliferazione ed una prematura progressione da G1 a S. Le cicline e i loro enzimi catalitici, cioè le chinasi ciclino-dipendenti, sono due gruppi importanti di

proteine intrinseche del ciclo cellulare. A loro volta, queste proteine sono regolate da una classe di proteine inibitrici note come inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti. Nei carcinomi squamocellulari orali si riscontra spesso una ridotta espressione degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti, p16^{ink4} e p27^{kip1}, con perdita di controllo del ciclo cellulare e aumento della proliferazione.

Alcuni geni, al contrario, controllano l'apoptosi, cioè la morte programmata delle cellule, e anche questi presentano alterazioni nei carcinomi. Nel cancro orale, le proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-X sono spesso iper-esprese. Inoltre, l'espressione della proteina pro-apoptotica Bax è stata positivamente correlata ad un'aumentata sensibilità alla chemioterapia nei tumori maligni del distretto testa-collo. In particolare, all'interno di questo gruppo di oncogeni, il gene BIRC5, che codifica per la Survivina, una proteina antiapoptotica iper-espressa nel carcinoma squamocellulare orale, è stato oggetto principale di questo studio. In molti carcinomi orali si osservano alterazioni anche a carico di altri oncogeni, coinvolti nella regolazione della crescita cellulare e nel trasporto dei segnali dalla membrana cellulare al nucleo. Tra questi ricordiamo i geni che codificano per i fattori di crescita, come int-2 e hst-1 (fibroblast growth factor), i recettori per i fattori di crescita come erbB1 e erbB2 (epidermal growth factor receptor), le proteine coinvolte nella trasduzione dei segnali come ras (proteine GTP-dipendenti), e proteine regolatrici delle funzioni nucleari come myc (proteina attivante la trascrizione).

Molti carcinomi orali evolvono a partire da una lesione pre-maligna, mentre altri sembrano insorgere ex novo, senza alcuna evidenza clinica o microscopica di lesioni preesistenti. I carcinomi invasivi possiedono la capacità di invadere la membrana basale, il tessuto connettivo e il sistema vascolare. Questi tumori infatti, hanno ottenuto un vantaggio biologico attraverso mutazioni molecolari a livello dei geni e delle proteine associate al movimento cellulare e alla

degradazione della matrice extracellulare. I cambiamenti nel fenotipo delle molecole di adesione cellulare (caderine e integrine) determinano il rilascio di cellule dal loro normale ambiente, conferendo loro la capacità di migrare. Questa caratteristica, insieme alla degradazione enzimatica della membrana basale e del tessuto connettivo, rappresentano le fondamentali componenti per l'invasione da parte di una neoplasia proliferativa. Nel carcinoma orale invasivo sono spesso alterate proteine critiche per l'adesione cellulare, come la molecola di adesione intercellulare (ICAM), la e-caderina e la neo-espressione della b-6 integrina, una proteina che assiste la mobilità dei cheratinociti. Nel carcinoma orale a cellule squamose è spesso riscontrata la tenascina, una molecola anti-adesione non evidente nella mucosa orale normale. Le proteine che degradano la matrice, prodotte dalle cellule tumorali e probabilmente da elementi del tessuto connettivo (fibroblasti, macrofagi), contribuiscono al danno a livello della membrana basale e delle proteine della matrice extracellulare. Le metallo-proteasi della matrice (MMPs 1, 2, 9, 13) sono state riscontrate nei carcinomi invasivi e si crede che abbiano un ruolo importante nella degradazione degli elementi del tessuto connettivo: in particolare, MMPs 3 e 13 sono associate a tumori maligni del distretto testa-collo in fase avanzata.

Per le masse tumorali che superano le dimensioni di 1 mm è necessario un ulteriore apporto ematico, che si instaura attraverso il meccanismo di angiogenesi. L'angiogenesi si ottiene attraverso un'induzione mediata dal tumore o tramite iper-espressione di proteine angiogenetiche, come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), i fattori di crescita fibroblastica (FGF) e/o attraverso la soppressione di proteine che inibiscono l'angiogenesi. VEGF, FGF e l'interleuchina 8 (IL-8), una citochina pro-infiammatoria, sono state identificate nelle neoplasie maligne della testa e del collo e si pensa siano almeno in parte responsabili dell'angiogenesi associata alla progressione di questi tumori. L'alterazione genetica che conduce all'iper-espressione di queste proteine non è stata ancora determinata, ma

probabilmente sono coinvolte anche interazioni con oncogeni critici e con geni immunosoppressori.

Nei carcinomi sono stati riscontrati polimorfismi genetici a carico di geni codificanti per enzimi coinvolti in processi di detossificazione, con la conseguente alterazione del metabolismo dei carcinogeni. Nel caso del cancro orale, ad esempio, il consumo di tabacco determina la formazione di sostanze cancerogene, come l'acetaldeide, che tendono ad accumularsi nell'organismo se i meccanismi di detossificazione sono alterati. Anche geni che codificano per enzimi di riparazione del DNA presentano spesso polimorfismi che comportano l'accumulo di errori genetici nella sequenza nucleotidica. Il sistema NER/BER (Nucleotide Excision Repair/ Base Excision Repair) è un sistema di enzimi che “tagliano e cuciono” errori dal DNA; un enzima chiave nel sistema NER è l'ERCC1: un polimorfismo del gene ERCC1 può destabilizzare l'RNA messaggero.

Un'altra caratteristica importante delle cellule tumorali è un aumento del ciclo replicativo. I telomeri sono dei complessi proteici del DNA, posti alla fine dei cromosomi ed adibiti alla stabilità cromosomale. Le cellule normali hanno un periodo di vita finito e correlato all'accorciamento del telomero che si verifica ad ogni successiva divisione cellulare: quando viene raggiunta una riduzione critica del telomero, il cromosoma e di conseguenza la cellula vengono degradati. Le cellule tumorali spesso sviluppano un meccanismo per conservare la lunghezza del telomero e quindi l'integrità del cromosoma, per questo sono dotate di vitalità a lungo termine. Questa caratteristica è associata alla produzione di telomerasi, un enzima assente nelle cellule adulte normali, ma presente in quelle neoplastiche. La maggior parte dei carcinomi del distretto testa-collo presenta un'attività telomerasica, che conferisce alle cellule neoplastiche un periodo di vita più lungo.

Non bisogna, inoltre, dimenticare che la patologia tumorale è una patologia della senescenza. Il processo di riparazione del DNA lavora ininterrottamente per correggere i danni nella struttura del DNA. Quando la cellula invecchia, tuttavia, la velocità di riparazione del DNA decresce fino a che non può tenere più il passo con la creazione del danno al DNA e la cellula va incontro ad uno dei tre possibili destini: (1) uno stato di dormienza irreversibile, detto senescenza; (2) il suicidio della cellula chiamato apoptosi o morte cellulare programmata, (3) la carcinogenesi, ossia la formazione del cancro.

1.4 Aspetti clinici

Il carcinoma squamocellulare orale non ha un aspetto clinico ben preciso: può presentarsi come una lesione bianca, rossa o mista, può avere una morfologia esofitica (papillare, verrucosa), endofitica, ulcerativa o presentarsi come una tumefazione[29]. A volte, le lesioni si apprezzano semplicemente come un aumento di consistenza della zona mucosa, pertanto nella valutazione clinica, oltre all'ispezione, è di particolare importanza anche la palpazione delle lesioni.

Le zone della cavità orale più a rischio sono il bordo linguale e il pavimento della bocca. Nella maggior parte dei casi i carcinomi orali sono asintomatici. Nelle lesioni linguali, a volte, i pazienti riferiscono dolore associato alle zone ulcerate.

Nei casi più avanzati si possono riscontrare alitosi, sanguinamento, fistolizzazioni cutanee, tumefazioni dei mascellari, difficoltà nella fonazione e nei movimenti della mandibola. Quando il carcinoma squamocellulare interessa la gengiva può provocare mobilità dentali a rapida insorgenza, mentre un interessamento osseo e nervoso può causare parestesie relative alla zona di innervazione.

Le sedi anatomiche maggiormente interessate sono, in ordine di frequenza:

- Labbro inferiore (30-40%)

Il carcinoma squamocellulare del labbro inferiore si sviluppa prevalentemente negli uomini, di carnagione chiara e in un'età compresa tra i 60 e gli 80 anni. In genere questi soggetti riferiscono occupazioni lavorative che impongono un'importante esposizione solare, come nel caso di



Figura 10 Labbro inferiore

contadini e marinai. L'incidenza è molto più alta nel sud dell'Europa che nel nord, probabilmente perché nel sud Europa è maggiormente diffuso il lavoro all'aria aperta. Nel 95% dei casi il carcinoma del labbro si sviluppa da una pregressa cheilite attinica o in fumatori di pipa o sigaro. In genere, interessa il vermiglio delle labbra nella zona centrale, con perdita della demarcazione tra cute e mucosa. Si può presentare sotto forma di ulcerazioni apparentemente inoffensive o con grandi alterazioni esofitiche, a volte verrucose, spesso a margini induriti. Spesso, la confusione con un'ulcerazione erpetica determina un importante ritardo diagnostico. Questa tipologia di carcinoma, generalmente, è una forma ben differenziata, che difficilmente dà metastasi. Le metastasi si manifestano per tumori di dimensioni superiori ai 2 cm, con interessamento dei linfonodi sottomentonieri, digastrici e della catena cervicale.

I carcinomi del labbro superiore sono meno frequenti di quelli del labbro inferiore, probabilmente perché il labbro superiore è meno esposto ai raggi solari; per contro la prognosi è peggiore.

- Bordi laterali della lingua (25%)

I bordi laterali della lingua, insieme alla superficie ventrale della lingua e al pavimento della bocca, sono le sedi più a rischio. Il terzo medio e posteriore del margine e del

ventre linguale sono le aree più colpite. Sono rare, invece, le localizzazioni sul dorso e sulla punta della lingua. Le lesioni del terzo posteriore (base) della lingua hanno una prognosi più sfavorevole delle altre data



Figura 11 Bordo laterale della lingua

la loro progressione silente in un'area difficile da osservare. Di conseguenza, quando vengono riscontrate, hanno già invaso profondamente i tessuti o hanno già dato metastasi loco-regionali, con una prognosi più infausta rispetto alle lesioni localizzate nei due terzi anteriori. Si manifesta più frequentemente in soggetti di sesso maschile, di età superiore ai 60 anni. Tuttavia, negli ultimi decenni sono in aumento le diagnosi in pazienti con meno di 45 anni: si tratta di forme legate a infezione da HPV, che interessano la base della lingua e l'orofaringe.

La lesione neoplastica può avere un aspetto ulcerativo/papillare, con colorazioni bianche, rosse o miste. Generalmente è asintomatica, ma la presenza di ulcere può essere dolorosa e provocare disfagia negli stadi tardivi.

Il carcinoma della lingua è una forma grave, che metastatizza velocemente, con interessamento dei linfonodi sottomandibolari, giugulo-digastrici e cervicali profondi, e un comportamento clinico molto aggressivo.

- Pavimento della cavità orale (20%)

Il carcinoma del pavimento della cavità orale è più frequente nei maschi ultra sessantenni, soprattutto tra i forti fumatori e bevitori. Si localizza in genere a livello dello sbocco del dotto di Wharton, nella parte anteriore del pavimento della bocca. Si presenta come un'ulcerazione dai bordi rilevati e induriti, spesso a partenza da una

eritroplachia. Il carcinoma, negli stadi più avanzati, può invadere i fasci muscolari del ventre linguale e limitare la mobilità della lingua. Frequentemente, già alla diagnosi, si riscontra un interessamento dei linfonodi sottomandibolari e della catena giugulare.

- Palato molle e trigono (15%)

I carcinomi squamocellulari del palato sono più frequenti nelle popolazioni asiatiche, in genere nei forti fumatori e bevitori di età avanzata. Si localizzano prevalentemente a livello del palato molle e del pilastro anteriore. Al contrario, sono rari a livello del palato duro, dove, data l'alta concentrazione di ghiandole salivari minori, sono più frequenti gli adenocarcinomi.



Figura 12 Trigono retromolare

Le lesioni appaiono come eritroleucoplachie, o come masse cheratosiche o ulcerazioni, e spesso

sono infiltranti, con interessamento dei linfonodi della catena giugulare e di quelli cervicali. I carcinomi palatali si riscontrano abbastanza di frequente in Paesi come l'India, dove è comune la pratica del reverse smoking.

- Gengiva e cresta alveolare (4%)

In questa sede il carcinoma assume l'aspetto di un'area verrucosa o ulcerativa. È frequente osservare l'invasione del legamento parodontale e dell'osso sottostante con conseguente mobilità dentale. Talvolta, la mobilità dentale rappresenta la prima manifestazione clinica del carcinoma.

- Mucosa vestibolare (1%)

Le lesioni appaiono come aree leucoeritroplasiche o verrucose. La maggior parte di esse metastatizza ai linfonodi sottomandibolari.

1.5 Diagnosi

La diagnosi si pone sulla base dell'integrazione dei dati clinici, strumentali ed istologici. Nell'ambito degli aspetti clinici, sono da ritenersi maggiormente a rischio le lesioni di grandi dimensioni, presenti da molto tempo, le ulcerazioni che non guariscono dopo la rimozione di eventuali fattori traumatici, le lesioni bianche, rosse e quelle non correlabili ad un'eziologia precisa. Queste caratteristiche devono essere considerate un campanello di allarme e obbligare ad approfondimenti strumentali ed istologici.

L'ortopantomografia e le radiografie endorali possono essere utili nella valutazione di un'eventuale invasione delle strutture dentali ed ossee. La TC (Tomografia Computerizzata) e la RMN (Risonanza Magnetica Nucleare) si rendono necessarie per valutare l'estensione del tumore primario e il coinvolgimento linfonodale; in particolare, la TC permette di valutare il coinvolgimento delle ossa mascellari, mentre la RMN fornisce informazioni più dettagliate sulla diffusione del carcinoma a livello delle parti molli e dei fasci vascolo-nervosi. La determinazione del coinvolgimento linfonodale rappresenta una tappa fondamentale ai fini del completamento dello staging pre-operatorio.

Attualmente, la biopsia e l'esame istopatologico rappresentano il "Gold Standard" per la diagnosi di lesioni potenzialmente maligne del cavo orale.

La biopsia deve essere eseguita nei punti clinicamente più significativi, quindi a livello delle aree rosse, ulcerate, indurite, evitando le zone necrotiche che non darebbero risultati significativi. Considerata la sensibilità e specificità dell'esame obiettivo intra-orale, fortemente dipendenti dall'esperienza del clinico che esegue la visita, e considerate alcune limitazioni dell'esame bioptico riportate in letteratura (e.g. campione poco rappresentativo di un'intera lesione, variabilità inter- e intra-operatore riguardo la classificazione di displasia, ecc.), negli

ultimi decenni si stanno indagando nuove metodiche per permettere uno screening più efficace dei pazienti a rischio ed una diagnosi precoce del tumore. Durante gli ultimi anni sono stati sviluppati strumenti diagnostici nell'intento di permettere una diagnosi precoce di OSCC. In modo particolare i metodi diagnostici ottici (autofluorescenza, chemiluminescenza, microscopia in vivo) vengono considerati un utile presidio per migliorare la visualizzazione delle lesioni, per agevolare il clinico nella scelta del sito o dei siti da biopsizzare e durante la fase di follow-up, fornendo in tempo reale e in modo non invasivo, immagini delle microstrutture tissutali. Ad oggi, nessuna di queste metodologie si è dimostrata capace di sostituire un accurato esame clinico seguito dal prelievo bioptico nella diagnosi delle patologie orali.

Nella valutazione diagnostica del carcinoma orale è importante tenere presente il principio della cancerizzazione di campo. Tale principio suggerisce che i pazienti affetti da un primo carcinoma della mucosa orale corrono il rischio di sviluppare, nel 35-40% dei casi, non una recidiva ma un secondo tumore indipendente, in una sede anatomica diversa dal tumore primario. Per recidiva si intende un carcinoma che insorge ad una distanza inferiore ai 2 cm dalla prima neoplasia; la recidiva si verifica dopo un intervallo inferiore ai 3 anni. Il secondo tumore primitivo, invece, è un carcinoma che insorge ad una distanza superiore ai 2 cm dalla prima neoplasia. Il secondo tumore primitivo può essere sincrono, quando le due neoplasie sono concomitanti o la seconda compare entro sei mesi dalla prima, oppure metacrono, quando la seconda neoplasia compare dopo sei mesi dalla prima. Pertanto, sia al momento della prima diagnosi sia durante il successivo follow-up, i pazienti affetti da un carcinoma squamocellulare devono essere sottoposti ad un attento controllo di tutte le mucose delle prime vie aeree digestive attraverso metodiche endoscopiche.

La diagnosi differenziale comprende (a) il carcinoma verrucoso, che è generalmente

caratterizzato da una crescita esofitica e più lenta dell'OSCC, e ha una prognosi più favorevole, (b) il carcinoma a cellule fusate e (c) il carcinoma a cellule basali, un carcinoma prevalentemente appannaggio della cute, che di solito si localizza nelle zone di passaggio tra la mucosa e il vermiglio delle labbra, con l'aspetto di una papula con una depressione centrale ricoperta da croste.

1.6 Istopatologia

A seconda del grado di differenziazione delle cellule neoplastiche, distinguiamo quattro tipi principali:

1. *Tipo bene differenziato (grado 1)*, in cui le cellule neoplastiche tendono a cheratinizzare e viene mantenuto un certo grado di organizzazione architeturale della lamina epiteliale.
2. *Tipo moderatamente differenziato (grado 2)*, in cui le cellule neoplastiche perdono in parte la capacità di produrre cheratina e si mantiene una parziale conservazione dell'architettura epiteliale.
3. *Tipo scarsamente differenziato (grado 3)*, in cui l'architettura epiteliale è completamente scompaginata e le cellule neoplastiche mostrano un intenso pleomorfismo che rende difficoltoso il riconoscimento della loro origine epiteliale.
4. *Tipo anaplastico (grado 4)*, in cui le cellule neoplastiche sono totalmente indifferenziate e non è possibile riconoscere l'origine istologica.

L'avanzare del grading è legato, quindi, al grado di organizzazione architeturale dei vari strati cellulari e all'entità delle atipie cellulari, quali pleomorfismo cellulare, aumentato rapporto nucleo/citoplasma, citoplasma abbondante ed eosinofilo, ipercromatismo nucleare, perle di cheratina o cellule isolate cheratinizzate. La prognosi è peggiore con l'aumento del grading, a

parità di condizione cliniche.

Oltre al classico aspetto istopatologico appena descritto, il carcinoma orale può mostrare una serie di variazioni morfologiche che possono creare non poche difficoltà interpretative.

1.7 Stadiazione clinica

Il trattamento del carcinoma orale, così come la maggior parte di tutte le altre neoplasie, si basa sulle dimensioni del tumore primario, la sede anatomica, l'estensione ai linfonodi e le eventuali metastasi a distanza. Ciò ha reso necessario l'impiego di una classificazione in stadi che permetta di uniformare i criteri che determinano la scelta delle modalità terapeutiche ottimali. Attualmente, il sistema più usato è la classificazione TNM, in cui ogni singolo tumore viene stadiato in base alle dimensioni (T) (Tabella3), all'interessamento linfonodale (N) (Tabella 4) e le eventuali metastasi a distanza (M) (Tabella5). L'uso di una classificazione clinica standardizzata è indispensabile per permettere il confronto tra varie modalità terapeutiche.

Tabella 3 *T – Tumore primario*

| Classificazione clinica del tumore primitivo (T) | |
|--|---|
| TX | Non è possibile individuare il tumore primitivo |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T0 | Non evidenza di tumore primitivo |
| T1 | Tumore di 2cm o meno nella dimensione maggiore |
| T2 | Tumore superiore a 2 cm ma non superiore a 4cm nella dimensione maggiore |
| T3 | Tumore superiore a 4cm nella dimensione maggiore |
| T4a | Labbro:tumore che invade la corticale ossea, il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale, la cute. Cavo orale:Tumore che invade la corticale ossea, in profondità i muscoli estrinseci della lingua, il seno mascellare, la cute. |
| T4b | Labbro e Cavo orale:Tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o infiltra l'arteria carotide interna. |

Tabella 4 N – Linfonodi regionali

| Classificazione clinica delle metastasi linfonodali (N) | |
|---|--|
| NX | Non è possibile individuare linfonodi regionali |
| N0 | Non metastasi ai linfonodi regionali |
| N1 | Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale, di 3 cm o meno nella sua dimensione maggiore |
| N2a | Metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale, maggiore di 3 cm ma inferiore a 6cm nella sua dimensione massima |
| N2b | Multipli linfonodi ipsilaterali, nessuno dei quali superiore a 6 cm nella sua dimensione massima |
| N2c | Linfonodi controlaterali o bilaterali, nessuno dei quali superiore a 6 cm nella sua dimensione massima |
| N3 | Metastasi in un singolo linfonodo maggiore di 6 cm nella sua dimensione massima |

Tabella 5 M – Metastasi a distanza

| Classificazione clinica delle metastasi a distanza (M) | |
|--|--|
| MX | Non è possibile individuare la metastasi |
| M0 | Non evidenza di metastasi |
| M1 | Presenza di metastasi |

La diffusione linfonodale viene valutata sulla base di una TC con mezzo di contrasto del massiccio facciale e del collo, mentre per indagare la diffusione metastatica per vie ematica, che prevalentemente coinvolge fegato e polmoni, vengono prescritte un'ecografia epatica e di radiografie del torace in due proiezioni.

Al fine di escludere la concomitante presenza di carcinomi a livello delle vie aeree, l'esame clinico deve includere la laringoscopia.

La presenza di possibili metastasi occulte può essere indagata mediante la PET (Tomografia ad Emissione di Positroni). Altre indagini utili ai fini della stadiazione includono gli esami ematochimici, e in particolare vengono richiesti: emocromo completo, elettroliti, funzionalità renale, funzionalità epatica, e tiroidea per i pazienti che verranno sottoposti a radioterapia.

Il livello di stadiazione viene definito dalla combinazione dei valori per ognuno dei tre parametri, secondo il seguente schema:

Tabella 6 *Stadiazione tumori*

| | | | |
|---|-------------|-------------|----------------|
| ■ | STADIO I | T1 | N0 |
| ■ | STADIO II | T1 T2 | N1 N0,N1 |
| ■ | STADIO III | T1,T2 T3 | N2 N0,N1,N2 |
| ■ | STADIO IV A | T4 | N0, N1 |
| ■ | STADIO IV B | Ogni T | N3 |
| ■ | STADIO IV C | Ogni T | Ogni N M1 |

1.8 Prognosi

La prognosi è correlata al grado di differenziazione istopatologico, alla stadiazione clinica e all'eventuale presenza di una seconda lesione primaria.

La sopravvivenza globale a 5 anni è del 50%, senza apprezzare miglioramenti negli ultimi 50 anni, nonostante i progressi nelle tecniche diagnostiche e terapeutiche.

Negli stadi I e II la sopravvivenza a 5 anni è dell'85%, mentre negli stadi III e IV scende drasticamente al 25%. La prognosi quoad valetudinem, tuttavia, è quasi sempre sfavorevole, a causa dell'aggressività delle terapie, che spesso rendono necessarie ampie resezioni ossee del massiccio facciale.

Le dimensioni del tumore e la positività linfonodale rimangono i due fattori prognostici più importanti e la diagnosi precoce rimane la modalità più efficace per migliorare la prognosi.

1.9 Terapia

Il piano di trattamento per il carcinoma orale viene impostato individualmente per ogni paziente, sulla base dei dati anamnestici, delle dimensioni, della sede anatomica e dello stadio

del tumore.

Lesioni di piccole dimensioni (T1), ad esempio, possono essere trattate con la sola radioterapia, mentre lesioni di dimensioni maggiori o localizzate in sedi ad alto rischio di metastatizzazione, come nel caso della lingua o del pavimento orale, necessitano terapie chirurgiche più o meno demolitive.

1.9.1 Chirurgia

La terapia chirurgica prevede l'asportazione della massa tumorale, a volte costringendo ad ampie resezioni del massiccio facciale, con svuotamento latero-cervicale del collo per l'asportazione di eventuali metastasi linfatiche.

La rimozione del tumore nel contesto dei tessuti molli deve prevedere un'ampia escissione che comprenda 1-1,5 cm di tessuto sano circostante, mentre nel contesto del tessuto osseo, l'exeresi del carcinoma prevede la rimozione di 2 cm di osso circostante radiograficamente sano.

La glossectomia parziale, o l'emiglossectomia, prevedono una ampia escissione indicata per il trattamento delle lesioni maligne della lingua.

Le resezioni mandibolari si classificano in resezioni marginali, in cui viene preservato il margine inferiore della mandibola, e in resezioni segmentali, quando viene sacrificata l'intera altezza della mandibola.

Le resezioni segmentali possono comprendere anche l'articolazione temporo-mandibolare. Spesso vengono eseguite resezioni composte, che prevedono l'asportazione in toto dei linfonodi della catena laterale cervicale, del tessuto osseo mandibolare e dei tessuti molli in corrispondenza della lesione primaria.

Lo svuotamento del collo si esegue sempre in caso di linfadenopatia palpabile, o positiva a indagini diagnostiche strumentali (TC, RMN). Più controversa è l'indicazione allo svuotamento in caso di linfadenopatia non evidente. La linfadenopatia può non risultare evidente in quella che si definisce la patologia occulta del collo. Molti studi hanno preso in considerazione l'ipotesi che la patologia occulta del collo sia associato al sito anatomico, alle dimensioni e allo spessore del tumore primario. Dati della letteratura mostrano come il carcinoma squamocellulare iniziale della lingua (T1/2, N0) in circa il 40% dei casi è associato a patologia occulta del collo. Per questo motivo, molti chirurghi, in presenza di un carcinoma primario della lingua, sono propensi ad eseguire lo svuotamento linfonodale. In misura minore, ma comunque con un rischio significativo, anche i carcinomi iniziali del pavimento della bocca sono associati alla patologia occulta del collo. Seguono con rischio decrescente le neoplasie della mucosa geniena, della mucosa gengivale mascellare e mandibolare e le neoplasie del labbro.

Lo svuotamento del collo può essere distinto in completo e selettivo. Lo svuotamento completo è uno svuotamento radicale, che si attua in caso di linfadenopatia palpabile (N+) e che prevede la rimozione di tutti i linfonodi del collo presenti nei livelli

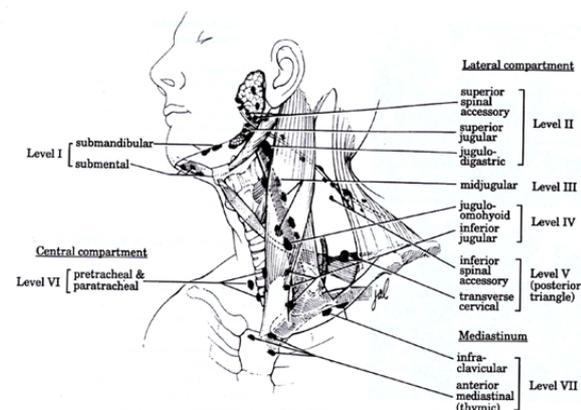


Figura 13 Stazioni linfonodali del collo

compresi tra I e V, insieme al muscolo sternocleidomastoideo, alla vena giugulare interna e al nervo spinale accessorio. Una forma di svuotamento radicale modificata (MRND= Modified Radical Neck Dissection) preserva o il muscolo sternocleidomastoideo, o la vena giugulare interna o il nervo spinale accessorio. Lo svuotamento selettivo, che si attua negli stadi N0 e in presenza di metastasi occulta del collo, prevede il sacrificio dei soli linfonodi, e più

comunemente solo di quelli compresi tra gli stadi I e III (sovra-omoioidei).

1.9.2 Radioterapia

Il trattamento radiante può avere funzioni diverse, a seconda delle caratteristiche del tumore e delle condizioni sistemiche del paziente: può essere utilizzata come terapia primaria, con funzione adiuvante o palliativa.

La radioterapia può essere somministrata come terapia primaria in caso di lesioni molto precoci; al contrario, in caso di neoplasie in fase avanzata, queste spesso non rispondono favorevolmente al trattamento radiante. La terapia radiante con funzione adiuvante viene somministrata nel post-operatorio della terapia chirurgica nei seguenti casi:

- Positività dei margini;
- Presenza di più di un linfonodo positivo, in assenza di invasione extracapsulare;
- Presenza di uno o più linfonodi positivi e di invasione extracapsulare;
- Lacerazione intraoperatoria del tumore;
- Interessamento osseo da parte del carcinoma, anche con margini negativi;
- Invasione perineurale;
- Concomitanza con una patologia immunosoppressiva (HIV/AIDS).

La radioterapia palliativa viene utilizzata in sostituzione della terapia chirurgica in pazienti che presentano forme neoplastiche in fase molto avanzata e non curabile, in pazienti anziani, in pazienti affetti da patologie sistemiche o che rifiutano il trattamento chirurgico.

La radioterapia convenzionale con fasci esterni viene frazionata in un periodo di tempo prolungato, per ridurre la tossicità collaterale a carico dei tessuti normali. La dose della frazione convenzionale varia da 1,8 a 2,55 Gray (Gy) per frazione, con una dose totale somministrata di

51-70 Gy. Alternativa alla radioterapia convenzionale è la brachiterapia, che può garantire ottimi risultati su piccole neoplasie, con minori danni collaterali, rendendo possibile, dove necessario, l'impiego di una terapia radiante convenzionale successiva in aree non irradiate, come può essere richiesto in caso di un secondo carcinoma primario. Promettente sembra essere la resezione chirurgica seguita da brachiterapia ad alte dosi che permetterebbe un migliore controllo della neoplasia in pazienti ad alto rischio [30].

1.9.3 Chemioterapia

In genere, i farmaci chemioterapici vengono somministrati come terapia neoadiuvante prima delle terapie loco-regionali. I dati della letteratura riportano che la migliore soluzione chemioterapica sia la combinazione cisplatino-fluorouracile, che sembra mostrare un effetto potenziato rispetto ai singoli farmaci, presentando un'elevata efficacia e una tossicità relativamente bassa.

Nel paziente con malattia avanzata, la somministrazione di chemioterapici a seguito dell'intervento non mostra risultati incoraggianti, in quanto spesso i pazienti sono già fortemente debilitati dal trattamento chirurgico.

1.9.4 Terapia combinata

Combinazione radioterapia – chemioterapia

La combinazione di radioterapia e chemioterapia sembra mostrare un più efficace controllo locale e un prolungamento dell'intervallo libero da malattia, rispetto alla sola radioterapia, apportando benefici in termini di sopravvivenza [31]. Recenti metanalisi di studi relativi alla radioterapia combinata alla chemioterapia neoadiuvante (pre-radioterapia), concomitante (durante la radioterapia) o aggiuntiva (post-radioterapia), hanno mostrato che i risultati più promettenti in termini di sopravvivenza si ottengono con la chemioterapia concomitante.

Combinazione chirurgia – radioterapia. Le lesioni primarie avanzate o localizzate a livello linfonodale (>3 cm), se trattate con una combinazione di terapia chirurgica e radiante, mostrano un migliore controllo loco-regionale, rispetto ad un unico approccio terapeutico.

2. Saliva nuova matrice non invasiva utilizzata come fluido biologico

2.1 La saliva: composizione

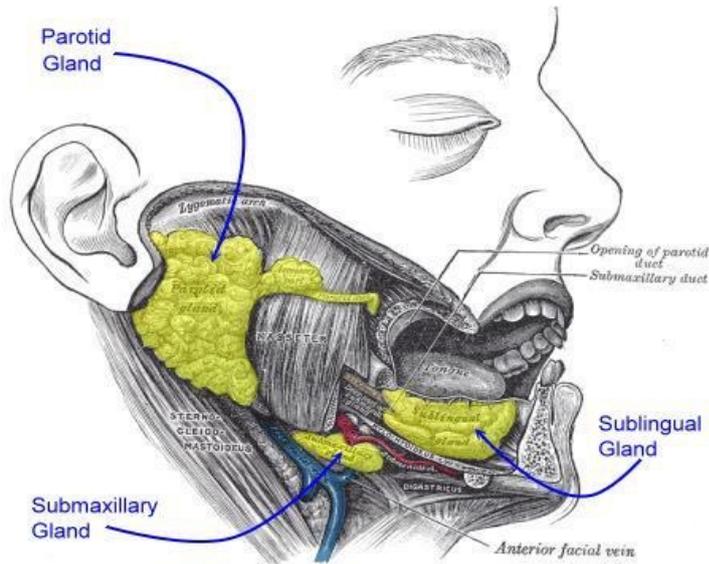
La saliva è il secreto delle ghiandole salivari che assicura la stabilità dell'ambiente "cavo orale". È un fluido biologico complesso, chiaro, leggermente acido (pH=6.0-7.0), che deriva dalla secrezione delle ghiandole salivari maggiori (i.e. parotidi, sottomandibolari, sottomandibolari) ed una moltitudine di ghiandole minori come le labiali, buccali, linguali e palatine e dal fluido gengivale crevicolare (Figura 14). In media le ghiandole salivari producono circa 1-1.5 L di saliva al giorno[35] (Tabella 7): la ghiandola sottomandibolare ne produce il 70%, la parotide il 25%, la sottomandibolare il 5%, le ghiandole salivari minori partecipano con una quota insignificante. Ciascun tipo di ghiandola salivare secerne un tipo caratteristico di saliva; infatti, le parotidi producono saliva di tipo sieroso quindi, più fluida e ricca di ptialina, le ghiandole sublinguali secernono saliva prevalentemente mucosa, perché ricca di mucine mentre le ghiandole sottomandibolari secernono saliva mista [36].

Tabella 7 *Salivazione spontanea*

| | | |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| veglia +/- 16 ore | 0,3 - 0,5 ml/min. | 300 - 480 ml |
| sonno +/- 8 ore | 0,05 - 0,1 ml/min. | 20 - 50 ml |
| masticazione +/- 30-60 minuti | 3 - 4 ml/min. | 200 - 250 ml |
| | | 500 - 800 ml/24 ore |

La produzione di saliva è sotto il controllo del sistema nervoso autonomo (SNA) e, in particolar modo, l'azione del parasimpatico a livello dei nuclei salivari superiori e inferiori, presenti rispettivamente nell'encefalo e nel ponte di Varolio, ha un peso rilevante nella produzione di saliva. Sia gli stimoli sui recettori periferici di tipo chimico e meccanico, dovuti alla presenza dell'alimento nella bocca e nello stomaco, sia gli stimoli visivi e olfattivi sono trasdotti in impulsi.

Altri impulsi provengono dal centro del vomito e anche l'irrorazione sanguigna, esercitata sulle



ghiandole, influisce sulla produzione della saliva. In particolar modo, con la stimolazione di fibre parasimpatiche post-gangliari colinergiche si ha: l'incremento del volume salivare prodotto, la diminuzione della concentrazione proteica e la vasodilatazione in tutte le ghiandole salivari [37].

Figura 14 Posizione della ghiandole salivari

Le fibre simpatiche post-gangliari adrenergiche hanno minor effetto sul volume salivare, mentre influenzano la composizione salivare aumentando la concentrazione proteica e la mucina. La stimolazione simpatica ha, inoltre, un effetto vasocostrittore. L'attivazione del simpatico non antagonizza le risposte parasimpatiche, ma modifica l'attività secretiva delle ghiandole salivari in modo diverso a seconda della specie [37]. La prevalenza dell'attività di una delle due sezioni del SNA determina la tipologia salivare.

La saliva contiene centinaia di componenti salivari e non salivari:

- Le componenti salivari derivano dalla secrezione delle ghiandole stesse
- Le componenti non salivari derivano da:
 - a) fluido gengivale crevicolare
 - b) secrezione nasale e branchiale
 - c) siero e derivati delle ferite

- d) rivestimenti epiteliali desquamati
- e) resti di cibo
- f) microrganismi del cavo orale

Il tessuto delle ghiandole salivari è costituito da due tipi di cellule, quelle acinose e quelle duttali. La saliva viene prodotta dalle cellule acinose, conservata nei granuli e rilasciata quando le ghiandole sono sottoposte a stimolo tramite le cellule duttali, le quali circondano i dotti salivari che permettono la fuoriuscita della saliva nel cavo orale.

Le funzioni della saliva sono:

- a) di regolare la digestione
- b) formazione del bolo
- c) agevolare il gusto
- d) lubrificazione
- e) funzioni immunitarie (peptidi antimicrobici e immunoglobuline) [38, 39]

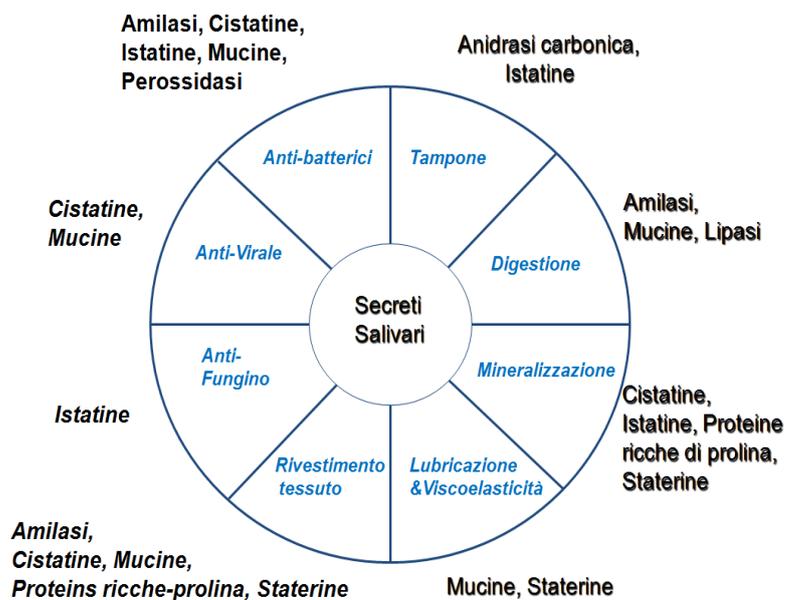


Figura 15 Proteine salivari e funzioni della saliva

La saliva è composta per il 98% da acqua e per il restante 2% da elettroliti (Na, K, Mg, Ca), mucopolisaccaridi, glicoproteine, sostanze antisettiche (e.g. IgA, lattoperossidasi, lisozima) e vari enzimi (e.g. α -amilasi, lipasi) (Figura 15).

La saliva acellulare contiene oltre un migliaio di proteine coinvolte in un ampio range di funzioni biologiche come mRNA, miRNA trascritti e metaboliti. Nell'ultima decade, la saliva è stata sempre più spesso investigata come possibile mezzo diagnostico per la diagnosi di patologie locali e/o sistemiche. La saliva, infatti, risponde concretamente all'esigenza di metodiche di screening non costose, non invasive e soprattutto facili da utilizzare. Da un punto di vista clinico, la saliva offre innumerevoli vantaggi come campione diagnostico in termini di raccolta, trasporto, stoccaggio, volumi di campionamento e costi se confrontata con i campioni di sangue od urine. Inoltre, è più facile da maneggiare durante le procedure diagnostiche: a differenza dei campioni di sangue, non coagula, riducendo in questa maniera il numero di manipolazioni. Oltretutto, per i professionisti, un test salivare è più sicuro rispetto alla raccolta del siero, il quale potrebbe esporre l'operatore a malattie trasmissibili per via ematica. Per il paziente, la raccolta non invasiva della saliva potrebbe ridurre drammaticamente l'ansietà ed il *discomfort*, incrementando la disponibilità a sottoporsi alle visite mediche/specialistiche. In questa maniera verrebbe incrementata l'opportunità di monitorare la salute generale del paziente nel tempo e di diagnosticare le patologie in uno stadio iniziale.

In realtà, la saliva viene usata come mezzo diagnostico già da più di 2000 anni. I medici di antiche culture consideravano la saliva come una parte della circolazione ed i cambiamenti nella sua composizione erano indicativi di certi aspetti della salute del paziente. Per esempio, venivano considerate la viscosità, l'odore e la sensazione gustativa della propria saliva; la scialorrea era collegata all'acidità gastrica, il gusto dolciastro era collegato con l'insufficienza

splenica. Queste teorie erano alla base delle prime applicazioni mediche della saliva come mezzo diagnostico.

Oggi, la saliva viene definita come lo “specchio della salute umana” e costituisce un *reservoir* di analiti di origine sistemica (Tabella 8) che raggiungono la cavità orale attraverso varie vie [40, 41]. Il termine “salivomica” è stato coniato nel 2008 per sottolineare la rapida acquisizione di conoscenze circa i costituenti della saliva. In soli 5 anni, i termini “proteomica salivare”, “trascrittomica”, “metaboloma” e “microbioma” sono entrati a pieno titolo nel lessico scientifico. L’analisi della saliva e dei suoi costituenti ha permesso ai ricercatori di scoprire, sviluppare e validare biomarkers per la diagnosi precoce di patologie locali e/o sistemiche, per il monitoraggio delle terapie e per la valutazione degli outcome prognostici. La disponibilità di cinque differenti “alfabeti diagnostici” all’interno della saliva, quali proteine, mRNA, miRNA, metaboliti e microrganismi, offre grandi vantaggi dal momento che gli stati patologici possono essere accompagnati da cambiamenti solo di una, e non di tutte, le dimensioni.

Tabella 8 *Analiti rintracciabili nella saliva*

| Saliva/biomarkers fluido orale | Possibilità d’uso |
|---------------------------------------|---|
| DNA | Genotipo standard Infezione batterica Diagnosi di carcinoma della testa e del collo Odontoiatria forense |
| RNA | Identificazione virus/batteri Carcinoma della testa e del collo |
| Proteine | Diagnosi di parodontite Diagnosi di carcinoma della testa e del collo Rilevare carie dentale |
| Mucine/glicoproteine | Diagnosi carcinoma della testa e del collo Rilevare carie dentale |
| Immunoglobuline | Diagnosi di virus (HIV, epatiti B e C) |
| Metaboliti | Diagnosi di parodontite |
| Farmaci e loro metaboliti | Monitoraggio di abuso di farmaci Analisi dei farmaci nel corpo |
| Virus, batteri | Riattivazione virus di Epstein-Barr (mononucleosi) |
| Materiale cellulare | Diagnosi di carcinoma della testa e del collo |

Considerando tutte le componenti molecolari della saliva è lecito pensare di poterla utilizzare

Tabella 9 *Alterazione composizione salivare*

| PATOLOGIA | ALTERAZIONE COMPOSIZIONE SALIVARE CONCOMITANTE | | |
|---------------------------------|--|-----------------------|----------------------------|
| Neoplasie maligne | ↑ proteine totali, ↑ IgA, ↑ lisozima | | |
| Neoplasie benigne | ↓ proteine totali, ↓ IgA, ↓ lisozima | | |
| Seialoadenosi | ↑ K ⁺ , ↓ Na ⁺ | | |
| Seialoadeniti croniche ed acute | ↑ albumina, ↑ proteine sieriche, ↑ lattoferrina, ↑ lisozima, ↑ IgA, ↑ IgG, ↑ IgM | | |
| Sindrome di Sjogren | Parametro | Valori normali | Sindrome di Sjogren |
| | Proteine totali | 230 | 265 |
| | IgA | 3,5 | 5,9 |
| | IgG | 0,5 | 1,0 |
| | Albumina (unità ml) | 0,8 | 1,3 |
| | Amilasi (unità ml) | 1400 | 1500 |
| | Sodio | 25 | 60 |
| | Potassio (mEq/ml) | 20 | 18 |
| | Cloro (mEq/ml) | 20 | 71 |
| | Tasso di flusso (ml/min) | 0,50 | 0,17 |

come fluido biologico e poterla rapportare al plasma ed al siero.

La saliva umana contiene, quindi, molte sostanze che possono fornire informazioni utili per la sorveglianza della salute e del benessere generale, della patogenesi di alcune malattie e della salute del cavo orale. Da un

punto di vista biochimico, i più importanti costituenti della saliva sono le proteine.

Siero e plasma rappresentano la scelta più popolare e ben accetta per i test clinici poiché il sangue è un fluido circolante che scorre nel nostro organismo passando anche da aree malate e tumorali. In questo suo passaggio da aree tumorali e malate si è notato che risultano variate le quantità di alcune proteine (Tabella 9). Cambiamenti nella concentrazione di specifiche proteine plasmatiche sono stati correlati con processi patologici, portando a ben accette applicazioni cliniche. Pertanto la saliva è potenzialmente attraente per la scoperta di biomarkers per alcune patologie, considerando la facilità di raccolta, che non è invasiva, di conservazione e processazione. Perciò risulta intuitivo confrontare e contrapporre le composizioni proteiche di saliva e plasma come determinato da numerosi laboratori nel mondo.

Significative sovrapposizioni del contenuto proteico tra saliva e plasma possono far pensare che la saliva potrebbe essere usata come alternativa diagnostica ai test sanguigni.

Il siero/plasma umano è dominato da immunoglobuline e albumine che compongono il 60-80% del peso totale [42], e le 22 proteine più abbondanti del plasma rappresentano il 99% del contenuto proteico totale del plasma. Queste numerose proteine saturano i gel e le colonne per la separazione e visualizzazione delle proteine e rendono impegnativa l'identificazione delle proteine meno abbondanti a causa dell'ampia gamma dinamica presentata dai biofluidi del plasma[43]

La riduzione delle numerose proteine plasmatiche è critica per migliorare le prospettive di identificazione delle proteine plasmatiche meno abbondanti[44]. Per la saliva umana, le 20 proteine più abbondanti rappresentano approssimativamente solo il 40% del contenuto proteico salivare.

I proteomi salivare e plasmatico sono stati confrontati anche basandosi sull'ontologia genica (GO) in termini di componenti cellulari, processo molecolare e funzione biologica. In generale la saliva e il plasma mostrano una distribuzione simile nelle 3 principali categorie GO.

Alcune eccezioni confrontando il plasma con la saliva si evidenziano nella funzione catalitica che è sovra-rappresentata, e nella funzione di regolatore della trascrizione che è sottorappresentata. Le distribuzioni delle proteine salivari sono maggiori nei processi proteici metabolici e catabolici confrontati con il plasma, le quali possono riflettere la sua funzione fisiologica principale nella digestione del cibo. Confrontata con il plasma la saliva è significativamente sovra-rappresentata nelle attività di idrolasi e peptidasi.

Le proteine salivari e plasmatiche sono sovra-rappresentate anche nelle componenti citoplasmatiche e citoscheletriche. In contrapposizione le componenti intracellulari sono sottorappresentate nella saliva e nel plasma. Per quanto riguarda i processi biologici, confrontati con il proteoma umano, la saliva e il plasma sono sovra-rappresentati nelle categorie della risposta

allo stimolo, risposta allo stress e nella biogenesi e organizzazione cellulare, ma sono sotto-rappresentati nella comunicazione cellulare e altri processi metabolici principali. La sovrarappresentazione di proteine coinvolte nei processi di risposta allo stimolo e risposta allo stress probabilmente riflette le funzioni di questi fluidi nel sistema di difesa corporeo. Nelle categorie funzionali molecolari nel Go i proteomi salivari e plasmatico sono significativamente sovrarappresentati nel legame proteico ma sono sotto-rappresentati nel legame di acidi nucleici, nell'attività di trasportatori e trasduzione del segnale. Il ruolo funzionale dei fluidi salivari include lubrificazione, processi antimicrobici, protezione dell'integrità mucosale e digestione del cibo. Le proteine che nella saliva partecipano ad una o più di queste funzioni includono mucine, amilasi, difensine, cistatine, istatine, proteine ricche di prolina, staterina, lattoperossidasi, lisozima, lattoferrina e immunoglobuline. Le funzioni di queste proteine possono essere ridondanti e sovrapporsi.

Tranne le immunoglobuline, le proteine con note funzioni salivari risultano normalmente assenti nel plasma, ma non sempre. Per esempio le proteine staterina e istatina sono specifiche della saliva. Il numero di isoforme e le concentrazioni di mucine, cistatine e proteine ricche in prolina nel plasma sono significativamente più basse che nei proteomi della saliva. Si pensa che la glicosilazione delle proteine salivari giochi un ruolo nelle funzioni protettive salivari; la caratterizzazione delle proteine glicosilate nella saliva e nel plasma ha riportato altre 70 proteine nella saliva[45-47] e oltre 300 nel plasma[48] come proteine glicosilate.

2.2 La saliva come mezzo diagnostico di patologie sistemiche

La saliva, quindi, è una matrice biologica ottenibile con metodiche di raccolta non invasive e le analisi conducibili su di essa sono adatte a misurare ormoni, farmaci, droghe, anticorpi, DNA microbico, mRNA salivare [41, 49-52]. Inoltre, un altro importante vantaggio dell'utilizzo della saliva come mezzo diagnostico, risiede nel fatto che i campioni possono essere mantenuti per

circa una settimana a 4 °C o per 24h a temperatura ambiente ma, oltre alla facile conservazione dei campioni, bisogna anche menzionare il limitato rischio infettivo per gli operatori che manipolano il campione di saliva, rispetto a quello di un campione ematico o di un campione urinario. L'applicazione della saliva per la diagnosi di malattie sistemiche ricevette una spinta nel 2002 come risultato di un progetto, finanziato dal *National Institute of Dental and Cranio-facial Research* (NIDCR), il cui principale *endpoint* era quello di sviluppare una piattaforma diagnostica portatile per la rapida analisi e rilevamento dei *biomarkers* salivari. Fino a due decenni fa, la diagnostica salivare era invece utilizzata solo per monitorare patologie del cavo orale, quali malattie parodontali e per valutare il rischio di patologia cariosa. Recentemente, grazie anche alle nuove conoscenze in campo biotecnologico, è stato possibile ampliare la diagnostica salivare anche nel campo delle malattie oncologiche e sistemiche. Tuttavia, la principale sfida nella diagnostica salivare è l'identificazione di marker diagnostici di patologia, tali da poterli traslare dalla ricerca di laboratorio alla diagnostica clinica.

Recentemente, Floriano et al. [60] hanno dimostrato come un gruppo di biomarkers salivari, quali proteina C reattiva, mio-globulina e mieloperossidasi insieme all'elettrocardiogramma, mostrino una correlazione significativa nei pazienti con infarto del miocardio rispetto ai controlli sani [60, 61]. Markers salivari sono stati ricercati anche per la malattia renale ed il cortisolo, i nitrati, l'acido urico, sodio, cloro, pH, amilasi e lattoferrina rientrano nella lista dei markers investigati [62]. Il fosfato salivare è stato usato con successo come biomarker per l'iperfosfatemia, la quale contribuisce alla calcificazione cardiovascolare nei pazienti con insufficienza renale cronica [63, 64]. Studi su campioni salivari sono stati realizzati per individuare le concentrazioni di glucosio nei pazienti con diabete mellito di tipo 2. Sfortunatamente, i livelli di glucosio salivare, relativamente facile da misurare, non si correlano in maniera significativa con i livelli di glucosio ematico. Tuttavia, uno studio recente ha

dimostrato un'alterazione quantitativa delle proteine salivari ottenute da pazienti con diabete di tipo 2 rispetto ai controlli sani; 65 proteine salivari, infatti, risultavano aumentate di ben 2 volte rispetto ai controlli sani [65]. In un studio del 2013 sono stati analizzati i livelli salivari di IL-1 β , -6 -8, TNF- α , MMP-8, TIMP-1 e lisozima di 441 pazienti [59]. I pazienti diabetici possedevano un rapporto MMP-8/TIMP-1 tre volte maggiore e, in particolare, una concentrazione molto più elevata di MMP-8 [66, 67]. Recentemente è stata descritta un'associazione delle MMP nell'aterosclerosi [68]. MMP-8 è stato riportato in associazione con aterosclerosi e sindrome metabolica [69, 70]. Infezioni orali, iperglicemia, ipertensione, e sindrome metabolica mostrano una significativa associazione con incrementati livelli salivari di lisozima [71, 72]. Le infezioni orali, come la malattia parodontale, sono state associate con la malattia cardiovascolare, il diabete mellito e l'artrite reumatoide [73, 74]. In Tabella 10 sono riportati i principali biomarkers salivari proposti per la diagnosi ed il monitoraggio di patologie sistemiche.

Tabella 10 Malattie sistemiche studiate attraverso la ricerca di biomarkers presenti nella saliva

| Malattie sistemiche diagnosticate dalla saliva | | | | | |
|--|---|----------------|------------------------------------|----|--------------------------|
| | Biomarkers | Level | Diagnosi | | |
| Malattie cardiovascolari | CRP | ↑ | infarto del [53, 54] | | |
| | Troponina 1 | ↑ | miocardio | | |
| Malattie renali | IL-8 | ↓ | Insufficienza renale cronica [55] | | |
| | MCP-1 | ↓ | | | |
| | IL-8/IL10 | ↓ | | | |
| | TNF- α /IL-10 | ↓ | | | |
| | TNF-α | ↓ | | | |
| | IL-1β | ↓ | | | |
| | γ-INF | ↓ | | | |
| | IL-6 | ↓ | | | |
| Diabete | Glucosio, plunc | ↑/↓ | Diabete 1-2, iperglicemia [56, 57] | | |
| | his-5 | ↑ | | | |
| | α-defensine 1,2,4 | ↑ | | | |
| | S100A9 | ↑ | | | |
| | PC | ↓ | | | |
| | His 1-3 | ↓ | | | |
| | Staterine | ↓ | | | |
| | MMP-8 | ↑ | | | |
| | MMP-8/TIMP-1 | ↑ | | | |
| | Malattie autoimmuni | β -difensina-2 | | ↓↓ | Sjogren [58] sindrome |
| β -difensina-1 | | ↓ | | | |
| MMP-2 MMP-9 | | ↑ | | | |
| Lattoferrina, IgA | | ↑ | | | |
| Malattie psichiatriche | Amilasi, cortisolo, sostanza P, lisozima, IgA secretorie, CGRP, neurochinina A, neurochinina P, testosterone, serotonina, triptofano. | | Ansia, dolore, stress | | |
| | Carie | Staterine | ↓ | | |
| | | His-1 | ↓ | | |
| | | PRP-1 | ↑ | | |
| | | PRP-3 | ↑ | | |
| | | His-5 | ↓ | | |
| | | IL-6 | ↑ | | |
| | | Chemochine | ↑ | | |
| | | PGE2 | ↑ | | |
| | | Fumatori | IL-8 | | ↑ |
| MMP-8 | | | ↑ | | |
| MMP-8/TIMP-1 | ↑ | | | | |
| Proteine totali | ↑ | | | | |

2.3 La saliva e le neoplasie non orali

Il cancro è uno dei principali problemi di salute pubblica in molti paesi. Attualmente 1 su 4 morti negli Stati Uniti è dovuta ad un cancro [75]. In particolare, la prognosi del cancro al pancreas è estremamente infausta, con uno dei più bassi tassi di sopravvivenza. Nuove strategie e biomarkers per la diagnosi precoce sono, perciò, estremamente necessari. Zhang e coll. hanno ritrovato che 4 mRNA (**KRAS**, **MBD3L2**, **ACRV1** e **DPM1**) nella saliva potrebbero differenziare i pazienti con il cancro al pancreas dai soggetti sani [76].

Il cancro alla prostata, escludendo le neoplasie cutanee, in termini di frequenza rappresenta la prima neoplasia negli uomini e la seconda causa di mortalità legata al cancro [77]. I livelli di **PSA** (Antigene Prostatico Specifico) libero e totale ed il loro rapporto (libero/totale) nella saliva sono stati comparati tra pazienti sani, pazienti con iperplasia prostatica e pazienti con cancro. È stata riscontrata una significativa differenza tra le quantità di PSA nel siero e nella saliva dei pazienti con cancro, rispetto ai controlli sani [78].

Per le donne invece, il cancro al seno rappresenta la più comune forma di neoplasia diagnosticata. Clinicamente l'uso dei biomarcatori per la diagnosi precoce potrebbe portare ad una significativa riduzione del tasso di mortalità per tale patologia. La proteina **c-erbB-2** è un marker prognostico ritrovato nel tessuto biopsizzato di pazienti con cancro al seno. Studi recenti suggeriscono che il frammento solubile della proteina c-erbB-2 può essere rilasciato dalla superficie cellulare e divenire rintracciabile nei pazienti con carcinoma del seno. Questa forma solubile è stata ricercata nella saliva e nel siero di 3 differenti gruppi di donne. Livelli aumentati dell'oncogene c-erbB-2 solubile sono stati ritrovati nel siero e nella saliva dei pazienti con cancro rispetto ai controlli sani e alle forme tumorali benigne [79].

2.4 La saliva ed il cancro orale

L'OSCC è una patologia complessa determinata da una serie di alterazioni genetiche piuttosto che da un singolo evento decisivo; pertanto, è probabile che una combinazione di biomarkers possa permettere di descrivere meglio tale patologia, con migliori valori di sensibilità e specificità per la diagnosi di OSCC. [80]

3. Individuazione di nuovi marcatori

Il biomarker ideale per la diagnosi tumorale precoce deve rispettare diversi criteri:

- 1) Deve poter essere misurato obiettivamente
- 2) Deve poter essere misurabile in piccoli campioni
- 3) Deve essere alterato nei tessuti ad alto rischio ma non nei tessuti normali
- 4) Deve essere alterato nei primi stadi durante lo sviluppo del tumore [81]

I biomarkers sono parametri biologici quantificabili e misurabili che possono servire come indici per predire stati della salute, aiutare nella diagnosi di stati di patologia, nei processi metabolici e negli studi epidemiologici. La scoperta dei biomarkers proteici è diventata un'applicazione centrale della proteomica. Il riconoscimento delle proteine nei tessuti e nei fluidi corporei nel corso della progressione della malattia potrebbe rilevare potenziali biomarkers indicativi di uno status specifico di malattia, che potrebbero essere utilizzati per future diagnosi mediche. L'analisi dei profili proteici prima e dopo trattamento farmacologico può fornire indizi vitali riguardo efficacia e tossicità dei farmaci. La proteomica è lo studio globale della struttura e funzione di tutte le proteine espresse in un sistema biologico. La mappatura dei proteomi consente di identificare i target proteici, esplorare i meccanismi di azione o tossicità dei farmaci e scoprire biomarkers di patologie cliniche consentendo l'applicazione degli stessi per la diagnosi. Una varietà di nuove tecnologie sono state ampiamente applicate per lo studio dei tumori umani.

3.1 La survivina

La Survivina è una proteina appartenente alla famiglia degli inibitori dell'apoptosi (IAP), localizzata a livello del fuso mitotico, ed in grado di bloccare la via apoptotica estrinseca indotta da Fas e quella intrinseca indotta dal rilascio del citocromo C dai mitocondri, per attivazione di

Bax.

L'espressione del gene della Survivina è regolata, a seconda della tipologia di cellula, da un meccanismo indipendente dal ciclo cellulare o da uno dipendente dal ciclo cellulare. La via indipendente dal ciclo cellulare, che viene regolata dalle citochine, è limitata alle cellule staminali CD 34+ durante l'ematopoiesi, ed alle cellule endoteliali durante la neoangiogenesi. Negli altri tipi di cellule, la Survivina è regolata da un meccanismo dipendente dal ciclo cellulare, e la sua espressione selettiva solo nella fase di transizione G2/M protegge le cellule dal processo di apoptosi durante la mitosi.

L'overespressione della Survivina è stata riscontrata in numerose neoplasie, tra cui il carcinoma squamocellulare orale.

Un lavoro, effettuato mediante analisi di immunistochemica, ha confermato la mancata espressione della Survivina nella mucosa orale normale, se non sporadicamente a livello dello strato basale e parabasale, e ha valutato i livelli di espressione della proteina nelle lesioni orali precancerose e nelle lesioni francamente neoplastiche di OSCC. Le lesioni neoplastiche hanno mostrato una positività alla Survivina del 100%. Nelle lesioni precancerose, la Survivina è stata evidenziata nel 33% dei campioni che non hanno mostrato una successiva progressione maligna e nel 94% delle lesioni che si sono evolute in carcinoma. I dati suggeriscono, pertanto, un potenziale ruolo predittivo attribuibile alla Survivina, in quanto, mostrando un'elevata espressione nelle fasi precoci della carcinogenesi, potrebbe dimostrarsi utile nell'identificazione delle lesioni precancerose ad alto rischio di trasformazione. [32]

Il valore predittivo della Survivina nell'ambito della carcinogenesi orale è stato valutato in uno studio del 2005, in cui i livelli della proteina sono stati quantificati mediante immunistochemica in 78 campioni di OSCC ed è stata eseguita un'analisi della sopravvivenza

mediante le curve di Kaplan-Meier e il modello di Cox, al fine di determinare il contributo dei singoli fattori prognostici associati al tasso di sopravvivenza. L'analisi ha mostrato che, tra le variabili analizzate (grado di differenziazione, dimensioni del tumore, stadio, recidive, presenza di metastasi linfonodali), solo lo stadio tumorale e le recidive sono predittivi della sopravvivenza. Se non vengono considerate le recidive (che rappresentano il fattore prognostico sfavorevole più attendibile), è stato evidenziato che alti livelli di Survivina, lo stadio del tumore e il grado di differenziazione sono strettamente associati alla sopravvivenza. I dati, a conferma degli studi precedenti, suggeriscono che la determinazione dell'espressione della Survivina permette di identificare precocemente i casi di OSCC più aggressivi, indirizzando le scelte terapeutiche al momento della diagnosi [33].

Ulteriori ricerche, finalizzate alla comprensione del preciso meccanismo molecolare che correla l'oncogenesi all'overespressione della Survivina, sono basate sull'ipotesi che le diverse funzioni attribuite alla Survivina nelle cellule tumorali possano essere spiegate, in parte, dalla presenza delle sue varianti derivanti dal processo di splicing alternativo. Piuttosto recentemente, infatti, sono state identificate diverse isoforme della Survivina classica: Survivina, Survivina 2, Survivina 2B, Survivina 3B e Survivina Ex3. Sembra che la Survivina 2 attenui l'attività antiapoptotica e che la Survivina 2B sia priva di potenziale anti-apoptotico, agendo come antagonista alle due isoforme anti-apoptotiche: la Survivina e la Survivina Ex3. Il ruolo della Survivina 3B non è conosciuto. La Survivina 2B sembra avere una localizzazione citosolica, mentre l'isoforma DEx3 una localizzazione nucleare.

Uno studio del 2009 si è occupato di valutare l'espressione delle isoforme della Survivina, attraverso procedure di RT-PCR e immunohistochimica, su tessuto orale normale, lesioni displastiche e tessuto di carcinoma squamocellulare orale, analizzando anche l'eventuale correlazione con le caratteristiche clinico-patologiche delle lesioni. I risultati hanno dimostrato

che la Survivina classica rappresenta l'isoforma più espressa, seguita, rispettivamente, dalla Survivina DEx3, Survivina 2B e Survivina 3B. Dallo studio non è stata riscontrata una correlazione significativa tra l'espressione delle singole isoforme e le caratteristiche clinico-patologiche analizzate: il grado di differenziazione, lo stadio e il coinvolgimento linfonodale. Tuttavia, è stato osservato che i livelli di Survivina 2B e 3B aumentano proporzionalmente dal grado G1 a G3. Inoltre, negli stadi avanzati (III, IV), rispetto agli stadi iniziali (I, II) e in presenza di metastasi, i livelli delle varianti DEx3 e 3B sono ridotti, mentre la Survivina 2B risulta aumentata [34].

Il ruolo specifico delle isoforme è ancora in fase di studio, tuttavia, recenti evidenze mostrano una funzione antiapoptotica riferibile alle isoforme Survivina e Survivina DEx3, mentre le isoforme 2a e 2B rivelano una funzione antagonista alle prime; la funzione della Survivina 3B è ancora sconosciuta [34].

3.2 Seldi

Negli ultimi anni, nell'analisi proteomica, un ruolo di rilievo è stato occupato dal SELDI-TOF/MS (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry), nato dalla combinazione di MALDI-TOF/MS e cromatografia di superficie[82].

Il SELDI-TOF/MS è una tecnica ad alto rendimento particolarmente indicata per lo studio di piccoli peptidi e proteine ($PM \leq 20$ KDa) con una sensibilità nell'ordine di femtomoli, che può fornire una analisi complementare all'elettroforesi bidimensionale.

Questa tecnica consiste nel legame delle proteine presenti in un fluido biologico su un chip funzionalizzato, Protein chip array® (Figura 16), in modo da legare le proteine in funzione delle loro differenti caratteristiche chimiche e fisiche.

Esistono diversi tipi di Protein chip array®:

- **Q10**: è un chip a scambio anionico forte che cattura molecole con cariche negative. Sulla superficie del chip sono presenti gruppi cationici che interagiscono con le cariche negative presenti sulla



Figura 16 Protein chip array® SELDI-TOF

- superficie delle proteine bersaglio (es. acido aspartico e glutammico);
- **CM10**: è un chip a scambio cationico debole che cattura molecole con cariche positive. Sulla superficie del chip sono presenti gruppi anionici carbossilati che interagiscono con le cariche positive sulla superficie dell'analita (es. lisina, arginina, istidina);
- **IMAC-30**: cattura molecole che si legano a ioni metallici polivalenti come nichel, rame, zinco, ferro e gallio. In superficie vi sono gruppi che chelano ioni metalli, ed è usato principalmente per proteine che contengono metalli;
- **H50**: cattura proteine di grandi dimensioni attraverso interazioni idrofobiche o in fase inversa. Ha in superficie catene metileniche, ed è utilizzato per rilevare proteine idrofobiche. L'analisi tramite SELDI-TOF/MS consta in più fasi.

Per prima cosa (Figura 17), bisogna scegliere il chip in base alle proteine da analizzare; poi, è necessario lavare energicamente la superficie del chip con tamponi differenti a seconda del chip utilizzato. Solo successivamente, si può applicare il campione adeguatamente preparato e, dopo un periodo di incubazione in cui le proteine si sono legate alla superficie del chip, si procede con dei lavaggi per eliminare le aspecificità che non si sono legate.

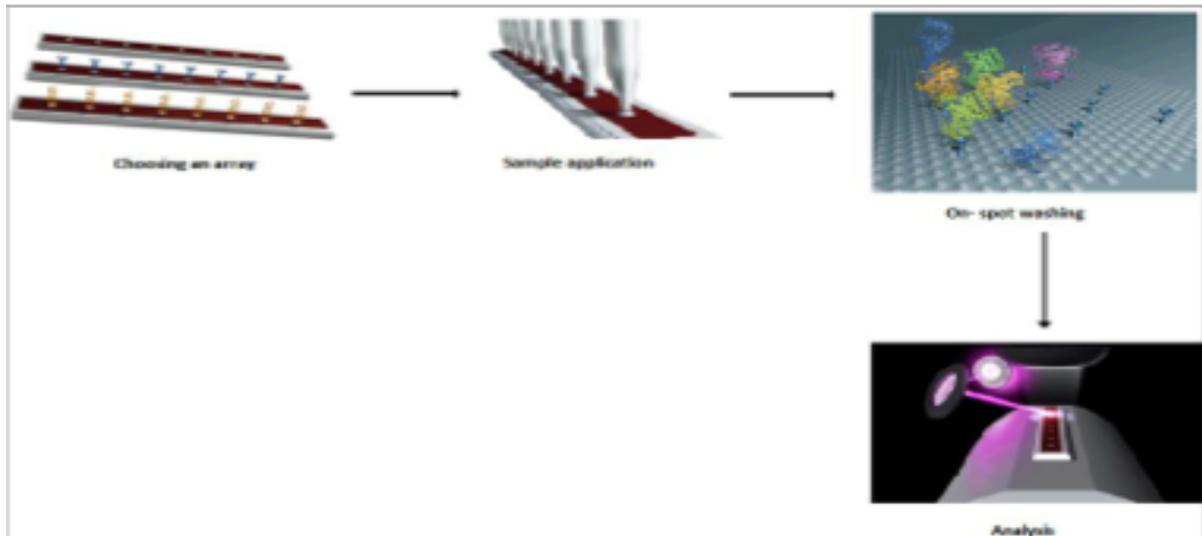


Figura 17 Procedura SELDI-TOF/MS Protein chip array®

Infine, viene aggiunta la Energy Adsorbing Molecules (EAM), una soluzione che, dopo essersi asciugata sul chip, si cristallizza e favorisce la ionizzazione delle proteine presenti. In ultimo, il chip viene posto nel lettore SELDI ProteinChip® per analisi di spettrometria di massa. All'interno del lettore SELDI ProteinChip®, un laser di azoto illumina il campione e avvia il processo di ionizzazione e desorbimento. In breve, l'energia del raggio laser induce sia una ionizzazione delle proteine sia un cambiamento di stato da fase cristallina-solida a fase gassosa.

Una volta in fase gassosa, le proteine, sotto forma di ione, possono muoversi rapidamente, o meglio volare verso il detector, grazie all'applicazione di una differenza di tensione. Proteine con carica positiva sono indotte a volare via dalla matrice metallica, che ha anche una carica positiva.

La sorgente SELDI registra il TOF (tempo impiegato dell'analita per arrivare al detector) dell'analita, e da questa misura ne deriva una massa altamente accurata e precisa in funzione della carica (m/z) (Figura 18).

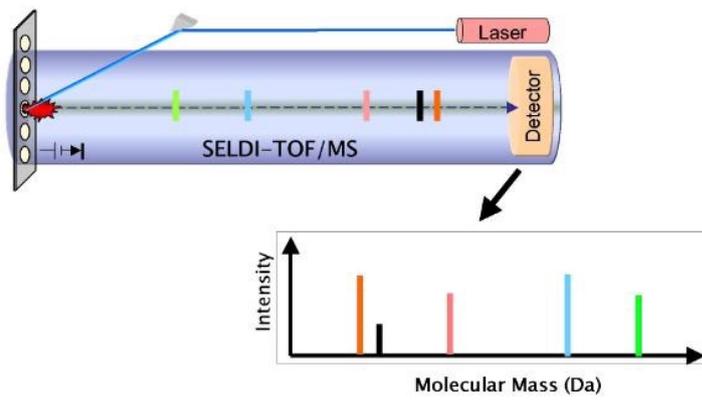


Figura 18 Analizzatore TOF (Time-Of- Flight Mass Spectrometry) e SELDI spectrum

4. Scopo dello studio

L'organizzazione mondiale della sanità ha evidenziato molte volte come l'unico fattore chiave in grado di aumentare la sopravvivenza nei pazienti affetti da OSCC sia la diagnosi precoce di questa patologia. Attualmente, la maggior parte dei test esistenti per l'individuazione e la diagnosi precoce del carcinoma orale sono caratterizzati da una bassa sensibilità e specificità. Pertanto, sarebbe utile individuare una metodica diagnostica che, oltre ad essere estremamente sensibile e specifica, superi tutti i limiti dell'esame visivo, permettendo così di identificare la patologia prima ancora che sia allo stadio avanzato, in modo da poter intervenire con terapie meno invasive per il paziente e che possano portare a risultati più soddisfacenti con interventi chirurgici meno invalidanti. C'è un crescente interesse scientifico rivolto alla saliva come fluido diagnostico considerando la raccolta semplice e minimamente invasiva della stessa [3, 83, 84]. Considerata la composizione ricca in proteine e cellule di sfaldamento provenienti dalla mucosa orale e lo stretto rapporto di contiguità con la superficie della massa tumorale, la saliva o fluido orale è stata considerata da tempo un ottimo campione per la ricerca di tali markers. La saliva corrisponde concretamente all'esigenza di metodiche di screening non costose, non invasive e soprattutto facili da utilizzare; essa da un punto di vista clinico offre innumerevoli vantaggi come campione diagnostico in termini di raccolta, trasporto, stoccaggio, volumi di campionamento e costi, se confrontata all'esame biotico, caratteristiche che la rendono matrice biologica ideale nello screening anche su ampia scala (e.g. programmi sanitari di comunità) di tali pazienti. I marker salivari sono stati indagati in letteratura utilizzando diverse metodiche di proteomica, genomica e trascrittomica. Il limite della diagnostica salivare è dovuto alla bassa concentrazione di analiti rispetto al siero e alla presenza di numerose sostanze contaminanti, e pertanto è necessario abbinare tecniche di detection molto sensibili e specifiche, quale la proteomica mediante SELDI che permette di rilevare anche le proteine presenti in bassissime

concentrazioni e con basso peso molecolare. Sebbene la metodica SELDI sia stata utilizzata per la ricerca di marcatori tumorali a partire da altri fluidi biologici, dall'analisi della letteratura scientifica è emerso che pochi sono gli studi che hanno utilizzato tale metodica per la ricerca di nuovi marker salivari per OSCC.

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare e individuare il profilo proteomico salivare mediante tecnica SELDI-TOF da una coorte di pazienti con carcinoma orale squamocellulare (OSCC) attraverso utilizzo di metodiche di proteomica complementari, quali SELDI-TOF, elettroforesi bidimensionale e MALDI-TOF/MS, al fine di determinare, nei pazienti con carcinoma squamoso del cavo orale, un profilo proteico salivare caratteristico della patologia. L'identificazione, con questo approccio, di nuovi potenziali biomarcatori di carcinoma del cavo orale potrebbe porre le basi per lo sviluppo di nuovi test di screening altamente significativi per la prevenzione e la diagnosi [85]. A tal fine, sono stati utilizzati 50 campioni salivari di soggetti affetti da OSCC (25 linfonodo-positivi, N+, e 25 linfonodo-negativi N-) e 50 campioni salivari di soggetti sani. I pazienti, inoltre, sono stati classificati anche in funzione dello stadio della malattia e della presenza o meno di metastasi.

5. Materiali e metodi

5.1 Reclutamento dei pazienti

Il reclutamento di ciascun paziente è avvenuto rispettando i criteri di inclusione ed esclusione riportati in Tabella 11 per i pazienti del gruppo di studio con OSCC.

Ciascun paziente reclutato è stato sottoposto a raccolta anamnestica, compilazione di una cartella clinica dedicata, esame obiettivo extra- ed intra-orale.

Al momento della prima visita, ai pazienti sono stati consegnati fogli informativi contenenti le istruzioni per la raccolta del campione salivare e sono stati prescritti esami ematochimici pre-biopsia. Al secondo incontro, il paziente è stato sottoposto a raccolta salivare e ad esame bioptico della lesione sospetta.

Tabella 11 *Criteria di inclusione e di esclusione nel reclutamento dei pazienti*

| <i>Criteria di inclusione</i> |
|---|
| Età > 18 anni |
| Lesione al cavo orale sospetta per OSCC primario |
| Nessun trattamento precedente (e.g. radio o chemioterapia) per OSCC (ad esclusione della biopsia incisionale diagnostica) |
| Assenza di malattie infettive |
| Assenza di patologie delle ghiandole salivari |
| Immunocompetenza |
| Acquisizione del consenso informato redatto e sottoscritto dal paziente |
| <i>Criteria di esclusione</i> |
| Indisponibilità a partecipare allo studio; |
| Dissenso al rilevamento dei dati anamnestici; |
| Rifiuto a sottoporsi all'esame obiettivo e alla raccolta dei campioni; |
| Rifiuto a sottoporsi all'esame bioptico; |

Tra tutti i pazienti sottoposti a biopsia, sono stati reclutati 50 pazienti con diagnosi documentata di OSCC primario e in assenza di precedenti trattamenti chirurgici, chemioterapici e/o radioterapici. Tutti hanno accettato la partecipazione volontaria allo studio.

Un numero uguale 50 di soggetti liberi da malattia matched per età e sesso è stato selezionato come gruppo controllo. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra

il gruppo test ed il gruppo controllo in termini di età media, sesso e abitudini voluttuarie. In particolare, il fumo di sigaretta è stato indagato chiedendo ai pazienti da quanti anni fumassero, quante sigarette/die consumassero e per quanti anni avessero fumato prima di togliere il vizio (se ex fumatori). Nessun soggetto del gruppo controllo ha riferito storia pregressa per patologie oncologiche, immunodeficit, malattie autoimmuni, epatiti o infezioni da HIV. Ciascuno degli individui del gruppo controllo, dopo lettura e sottoscrizione del consenso informato, è stato sottoposto ad esame clinico obiettivo per confermare l'assenza di lesioni mucosali sospette o infiammazioni nella cavità orale. La mucosa orale deve apparire

sana, senza eritemi e desquamazioni epiteliali per poter procedere alla raccolta del campione salivare.

5.2 Raccolta campione saliva

La saliva non stimolata è stata raccolta tra le 9 e le 10 di mattina secondo i protocolli pubblicati[86]. Ai partecipanti è stato chiesto di astenersi dal mangiare, bere, fumare, o dall'eseguire procedure igieniche, ed è stato richiesto uno sciacquo della bocca con acqua prima della raccolta della saliva. Ciascun partecipante è stato sottoposto a una visita



Figura 19

odontoiatrica, per assicurarsi che non siano presenti lesioni della mucosa sospette o infiammazioni nella cavità orale del gruppo di controllo: la mucosa orale deve apparire sana, senza eritemi e desquamazioni epiteliali. Sono stati immediatamente aggiunti alla saliva prelevata inibitori di RNasi (Superase-In, Ambion Inc., Austin, TX, USA) e un cocktail di

inibitori di proteasi (Sigma, St. Louis, MO, USA). I campioni sono stati centrifugati a 2600 g per 15 min (4°C), ed il supernatante è stato aliquotato e conservato a -80°C o in azoto liquido. Il trattamento tempestivo dei campioni di saliva è essenziale quando si realizzano analisi proteomiche[87], in quanto l'attività enzimatica intrinseca della saliva dovrebbe essere fermata al momento della raccolta al fine di inibire l'attività enzimatica in corso che è probabile attacchi proteine che non sono coinvolte in percorsi biologicamente rilevanti.[88] Per prevenire la degradazione delle proteine, è stato aggiunto 1 microlitro/ml di cocktail inibitori delle proteasi della saliva è stato aggiunto.

5.3 Analisi proteomica SELDI-TOF

L'analisi proteomica SELDI-TOF è stata effettuata utilizzando *ProteinChip* con differenti caratteristiche di legame, secondo i protocolli forniti dal produttore BIORAD. Una volta attivati i chip utilizzando gli opportuni tamponi, è stata caricata una quantità di saliva corrispondente a 10 µg di proteine miscelata in rapporto 2:3 v/v con una soluzione denaturante costituita da 9 M di urea, 2% CHAPS e 100 mM DTT. I campioni sono stati ulteriormente diluiti nel buffer di lavaggio e 150 µL sono stati caricati sul ProteinChip ed incubati per 30 minuti in costante agitazione. Successivamente, i chip sono stati lavati per rimuovere le proteine non legate; la soluzione di lavaggio adottata è stata il TRIS HCL 0.1M a pH 8.8. Infine ad ogni spot proteico, venivano aggiunti 2 µL di una matrice costituita da acido sinapinico per facilitare la ionizzazione del campione. La matrice (5 mg di SPA) è stata preparata al momento d'uso e cioè è stata solubilizzata in 200 µL di una soluzione costituita da acido trifluoroacetico 0.5% e acetonitrile 50%; in tal modo è stata preparata una soluzione satura di matrice diluita poi 1:1 prima dell'aggiunta sulla superficie degli spot di ciascun ProteinChip. Dopo aver atteso l'assorbimento completo e la cristallizzazione della matrice, i ProteinChip sono stati analizzati utilizzando il SELDI-TOF reader (BioRad Inc) utilizzando protocolli di acquisizione

standardizzati. La lettura del “tempo di volo” (TOF), eseguita dal reader, permette di estrapolare attraverso un algoritmo matematico il valore di m/z (rapporto massa/carica) di ciascuna proteina. Il software ProteinChip data manager è stato utilizzato per l’analisi dei dati; tale software riporta i dati ottenuti come uno spettro in cui vengono tracciati l’intensità di segnale sulle ordinate e il rapporto m/z sulle ascisse.

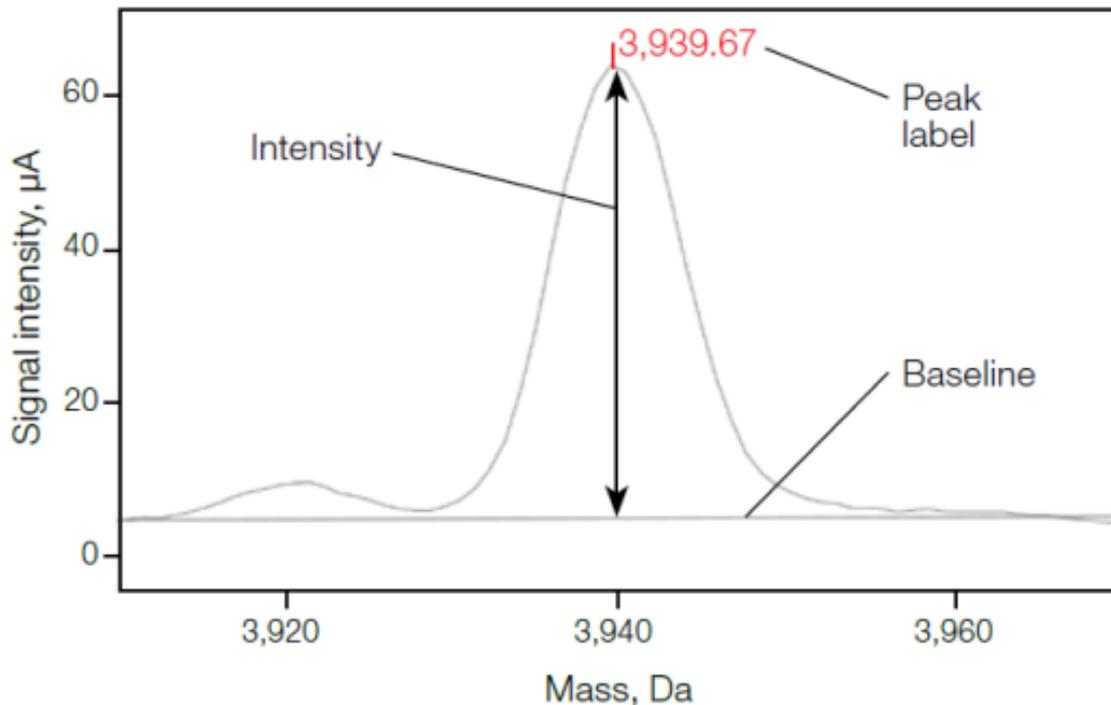


Figura 20 Anatomia di un picco. I picchi vengono marcati automaticamente dal software. Il software calcola l’intensità del picco come distanza dall’apice alla base di esso. Immagine scaricata da Google Search, open source

Dal momento che la carica della maggior parte di proteine e peptidi ionizzati è pari ad 1, il valore m/z di una proteina, calcolato mediante SELDI, è equivalente alla sua massa molecolare più 1 Da. In tal modo è stata ottenuta una serie di spettri che rappresentano graficamente il profilo proteico del campione. All’interno di ciascuno spettro, i picchi rappresentano le proteine o i componenti peptidici del campione e la loro intensità corrisponde all’ammontare delle specie nel campione (ossia i livelli di espressione). Brevemente, il processo SELDI può essere descritto come segue: 1) catturare o ‘dock’ una o più proteine sul chip array proteico

direttamente dal materiale originale, senza preparazione del campione o senza 'etichettatura' del campione, 2) aumentare il rapporto (oppure indice)'signal-to noise' (segnale-rumore) riducendo il 'rumore' chimico e biomolecolare (i.e. ottenere una ritenzione selettiva del target sul chip lavando via materiali indesiderati); 3) leggere una o più delle proteine target ritenute con un processo rapido, sensibile, laser-indotto che fornisce un'informazione diretta sul target (peso molecolare); e 4) processare (caratterizzare) le proteine target in una o più sedi qualsiasi nell'array indirizzabile direttamente in situ in uno o più legami sul chip (on-the chip) binding o reazioni di modificazione per caratterizzare la struttura e la funzione proteica.

Dopo le analisi, tutti gli spettri proteici sono stati compilati, e i picchi di massa qualificati con un indice segnale-rumore >5 (signal-to-noise ratio >5) con indici di massa-per-carica (mass-to-charge) (m/z) tra 2000 e 150000 che sono stati rilevati automaticamente. I cluster di picco (peak cluster) sono stati completati usando una selezione di picchi di secondo passaggio (con un segnale-rumore >2) in una finestra di massa di 0.3% e sono stati aggiunti picchi stimati. Le intensità di picco sono state normalizzate alla corrente ionica totale di m/z tra 2000 e 150000 e sono state realizzate statistiche descrittive. Una delle caratteristiche degli spettri proteici è che i picchi centrati ai valori di massa più alti tendono ad essere più ampi e più bassi dei valori di massa bassi.[51] Una tale trasformazione in generale riduce il range di intensità dei dati. Come risultato, la varianza dell'intensità dei picchi trasformati (attraverso campioni multipli) tende ad essere meno volatile sull'intera lunghezza dello spettro: queste tecniche analitiche sono state realizzate usando un software proteinchip 3.0 [41].

5.4 Analisi della survivina

Ai pazienti è stato chiesto di astenersi da mangiare, bere, fumare e praticare l'igiene orale per almeno 1 ora prima della raccolta della saliva[89]. Quindi sono stati raccolti 5 ml di saliva intera

per ogni soggetto. In precedenza, gli era stato chiesto di sciacquare la bocca con acqua e poi espettorare la saliva in un tubo da centrifuga da 50 ml.

I campioni raccolti sono stati immediatamente centrifugati a 5000 g per 5 minuti a +4°C per rimuovere i cell pellets e i detriti. I sovrinatanti sono stati poi divisi in due aliquote e conservati a -80°C per successive analisi.

Enzyme linked immunosorbent assay Enzyme-linked immunosorbent assay (Total Survivin Titerzyme®

Enzyme Immunoassay, Assay Designs, Ann Arbor, MI USA) sono stati realizzati per determinare i livelli di survivina nei campioni di saliva di oscc (n=55) e dei pazienti controllo (n=30). I campioni non diluiti sono stati caricati in duplice copia su una piastra 96-microtiter rivestita con anticorpi monoclonali anti-umani di survivina. Al fine di quantificare i livelli di survivina, in ogni esperimento è stata creata una curva standard con quantità crescenti di survivina ricombinante purificata. Dopo l'incubazione a temperatura ambiente su una piastra shaker per 1 ora a 500 giri al minuto, i campioni in eccesso o standard sono stati lavati via e un anticorpo policlonale di coniglio alla survivina è stato aggiunto.

Dopo un'altra ora di incubazione, l'anticorpo in eccesso è stato lavato via e sono state aggiunte IgG di capra anti coniglio coniugate con perossidasi di rafano. Dopo 30 minuti di incubazione, il coniugato in eccesso è stato lavato via ed è stata aggiunta una soluzione substrato di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Dopo altri 30 minuti di incubazione, la reazione enzimatica è stata fermata e il colore generato è stato letto immediatamente a 450 nm. La densità ottica misurata era direttamente proporzionale alla concentrazione di survivina sia negli standard che nei campioni.

6. Risultati

Nel presente studio, sono stati arruolati un totale di 100 pazienti: 50 pazienti con OSCC primario (gruppo caso) e 50 pazienti sani (gruppo controllo). Tutti i pazienti del gruppo caso sono stati sottoposti a biopsia incisionale diagnostica ed il successivo esame istologico ha confermato la diagnosi sospetta di carcinoma.

Il gruppo di pazienti con OSCC è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi sulla base dello stadio iniziale o tardivo del Carcinoma (Tabella 12). Considerando la prognosi e le curve di sopravvivenza a 5 anni dei vari stadi, si sono considerati gli Stadi I-II come *early stage* OSCC (EsOSCC), mentre gli stadi III-IV come *late stage* OSCC (LsOSCC). L'età media dei due sottogruppi non mostra sostanziali differenze. In ciascun sottogruppo i vari Stadi sono equamente suddivisi (Stadio I: 42,8%, Stadio II: 57,2%, Stadio III: 53,8%, Stadio IV: 46,2%). È interessante notare come, mentre per definizione c'è una sostanziale differenza del coinvolgimento linfonodale, non vi è una significativa differenza del grading istologico nei due sottogruppi, dal momento che G2 è il grado più rappresentato nel 57,2% e 53,8%, rispettivamente. Sia nel gruppo EsOSCC che LsOSCC il sito più rappresentato è la lingua (71,4 e 30,8%, rispettivamente). Gli OSCC del pavimento orale risultano più frequentemente associati ad uno stadio avanzato della malattia: questo è probabilmente da mettere in relazione alle caratteristiche anatomiche di questo sito, che offre poche barriere alla diffusione tumorale ed al coinvolgimento dei tessuti limitrofi sottomandibolari. D'altro canto, l'OSCC della mucosa geniena, considerate le caratteristiche anatomiche di questo sito e la sua più facile ispezionabilità, è riscontrato più frequentemente nel gruppo EsOSCC piuttosto che nel gruppo LsOSCC.

Tabella 12 *Analisi statistica gruppo early stage OSCC e gruppo late stage OSCC*

| | Early Stage OSCC | | Late Stage OSCC | |
|--------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| | n. | % | n. | % |
| Age (years) | | | | |
| Mean +/- SD | 68,7 +/- 9,05 | | 65,7 +/- 14,26 | |
| Range | 41-89 | | 57-82 | |
| Sex | | | | |
| Male | 1 | 14 | 8 | |
| Female | 6 | 86 | 5 | |
| Clinical Stage | | | | |
| Stage I | 3 | 42,8 | - | - |
| Stage II | 4 | 57,2 | - | - |
| Stage III | - | - | 7 | 53,8 |
| Stage IV | - | - | 6 | 46,2 |
| Nodal Involvement | | | | * |
| N+ | 0 | 0 | 13 | 100 |
| N- | 7 | 100 | 0 | 0 |
| Grading | | | | |
| G1 | 1 | 14,2 | 1 | 7,8 |
| G2 | 4 | 57,2 | 7 | 53,8 |
| G3 | 2 | 28,6 | 5 | 38,4 |
| Tumor sites | | | | |
| Tongue | 5 | 71,4 | 4 | 30,8 |
| Floor of mouth | - | - | 3 | 23 |
| Gingiva | 1 | 14,3 | 3 | 23 |
| Soft palate | - | - | 2 | 15,4 |
| Buccal mucosa | 1 | 14,3 | 1 | 7,8 |

In **Tabella 13** sono riportate le caratteristiche principali dei gruppi caso e controllo, dove non si evidenziano differenze statisticamente significative in rapporto ad età media, sesso (rapporto M/F), ed abitudini viziate.

Tabella 13 *Caratteristiche principali gruppo caso e gruppo controllo*

| | Gruppo caso | Gruppo controllo |
|-----------------------|-------------|------------------|
| Età media | 66,8 | 61,9 |
| M/F | 0,4285 | 0,3935 |
| Fumatori > 10 sig die | 45% | 35% |
| Ex fumatori | 25% | 20% |
| Consumo di alcol | 30% | 20% |

L'analisi proteomica dei campioni salivari ottenuti da tutti i pazienti è stata effettuata mediante tecnica SELDI-TOF. I campioni sono stati analizzati singolarmente ed i risultati ottenuti sono stati riportati come valori medi. L'analisi ha permesso di individuare picchi diversamente espressi tra i diversi gruppi. Ogni picco rappresenta un rapporto m/z ben definito, tale rapporto corrisponde ad una proteina. In **Tabella 14** sono riportati i rapporti m/z individuati nei vari gruppi, e le differenze statisticamente rilevanti. Nella colonna di sinistra della tabella, sono stati confrontati i picchi ottenuti nel gruppo controllo e quelli del gruppo EsOSCC.

La proteina identificata dal rapporto m/z 8940,68, riscontrata nei due gruppi, ha mostrato una differenza statisticamente significativa con un p -value $<0,008$. Anche la proteina 7096,16, aumentata nel gruppo EsOSCC (p -value <0.023), rappresenta un buon marcatore di malattia con ROC pari a 0.92. L'analisi ha ancora evidenziato che le proteine identificate dai rapporti 5774,76 e 12712,45 si mostravano differenti nei due gruppi con differenza statisticamente significativa ($p < 0,03$) ed un trend nel gruppo EsOSCC in diminuzione. Mentre le proteine 8086,72 e 11002,25 erano diversamente rappresentate nei due gruppi con un trend nel gruppo EsOSCC in aumento. In Tabella 19, nella colonna di destra, è stato riportato il confronto dei picchi ottenuti dopo analisi proteomica nei gruppi EsOSCC e LsOSCC. La proteina 8940,68 non ha mostrato una differenza statisticamente significativa nei due gruppi analizzati.

Dall'analisi dei clusters è stato possibile individuare 19 differenze di espressione dei picchi di massa carica dei campioni del gruppo ES-OSCC e quello dei pazienti sani (HS).

In particolare, 11 picchi di massa erano maggiormente espressi nella saliva del gruppo ES-OSCC, mentre 8 sono risultati meno espressi. Nella Tabella 14, sono presenti tutti i valori di m/z, p-value, ROC, Trend in ES-OSCC e Fold-changes dei picchi di massa diversamente espressi nei due gruppi (ES-OSCC e HS).

Tra i 19 picchi di massa/carica riscontrati, 2 hanno mostrato una più alta associazione con ES-OSCC. Questi picchi, 8041 e 6239 m/z, presentavano, nella saliva dei pazienti OSCC, livelli di escrezione di 22 e 17 volte maggiori che nei soggetti sani di controllo.

Nella Figura 21 sono rappresentati tutti i picchi di massa differentemente escreti tra ES-OSCC e HS. In maniera particolare, sono evidenziati i picchi 8041 e 6239 m/z che presentavano la più alta associazione, nell'analisi univariata, con il gruppo ES-OSCC.

Tabella 14 *Differenze di espressione dei picchi di massa riscontrati tra i ES-OSCC e HS. I valori dei picchi di massa in grassetto sono quelli maggiormente incrementati nel gruppo ES-OSCC, mostrati anche nella Figura 20.*

| m/z | p-value | ROC | trend in ES-OSCC | Fold-change |
|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|--------------------|
| 8.041.439 | 1.80E-08 | 1.00E+00 | increased | 22 |
| 6.239.286 | 8.71E-08 | 9.63E-01 | increased | 17 |
| 7.989.347 | 7.77E-06 | 8.70E-01 | increased | 4.4 |
| 6.165.611 | 5.55E-05 | 8.52E-01 | increased | 3.4 |
| 8.086.723 | 2.75E-05 | 8.70E-01 | increased | 3.2 |
| 5.235.992 | 1.91E-04 | 7.78E-01 | increased | 2.6 |
| 6.344.737 | 8.49E-04 | 7.96E-01 | increased | 2.5 |
| 6.076.276 | 9.93E-05 | 8.33E-01 | increased | 2.3 |
| 5.774.765 | 0.014988 | 0.685185185 | increased | 2 |
| 7.668.023 | 0.014056 | 0.685185185 | increased | 1.6 |
| 23443.65 | 0.027737 | 0.685185185 | increased | 1.5 |
| 3.353.005 | 9.23E-04 | 2.41E-01 | decreased | 4.5 |
| 3.482.388 | 0.003779 | 0.240740741 | decreased | 3.5 |
| 3.433.245 | 0.004376 | 0.277777778 | decreased | 3.3 |
| 4.136.672 | 0.024619 | 0.314814815 | decreased | 3.1 |
| 11948.79 | 4.68E-04 | 2.04E-01 | decreased | 2.2 |
| 16807.14 | 0.011559 | 0.277777778 | decreased | 2.2 |
| 6.913.176 | 0.003509 | 0.259259259 | decreased | 2 |
| 10203.09 | 0.048918 | 0.333333333 | decreased | 1.3 |

Inoltre, sono stati messi a confronto anche i picchi di massa espressi nel gruppo ES-OSCC e in quello LS-OSCC.

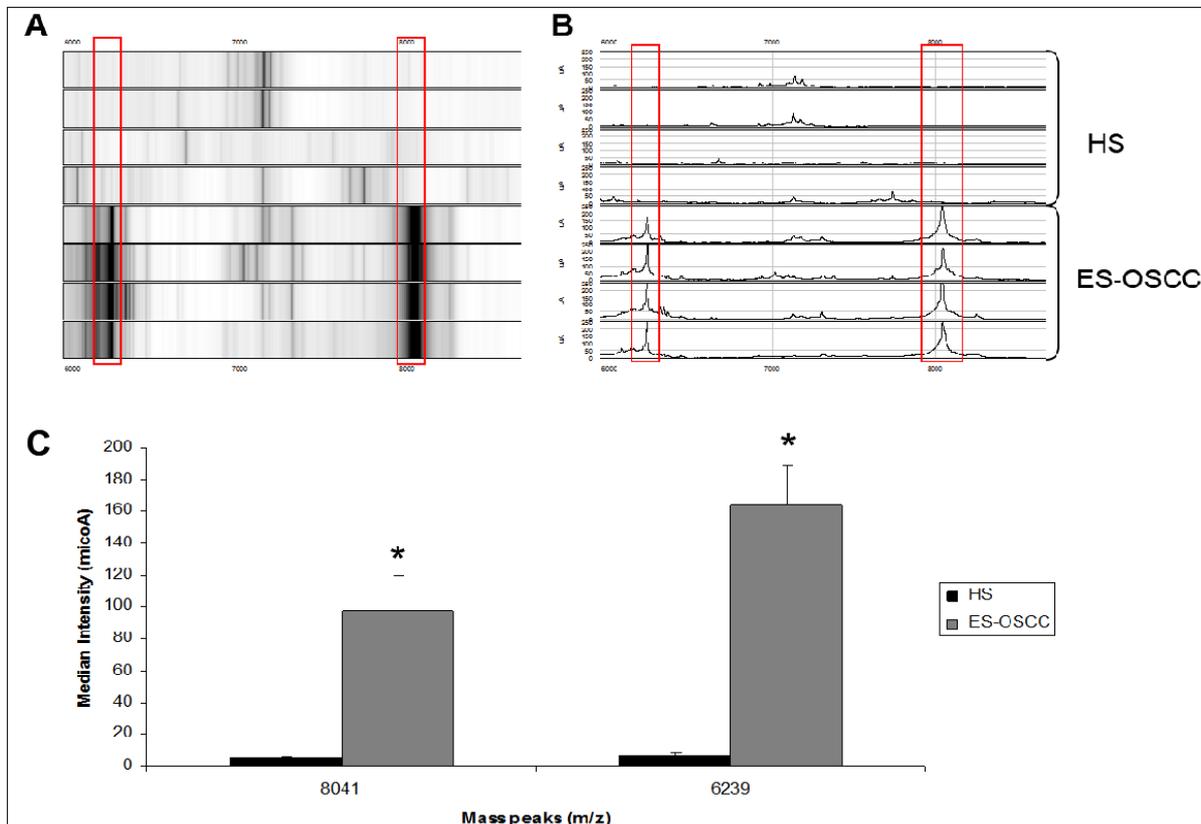


Figura 21 Rappresentazione in gel (A) e spettri di massa (B) dei due markers (6239 and 8041 m/z) individuati nell'ES-OSCC. Istogramma intensità mediana globale in tutti i pazienti HS e ES-OSCC (C) *= p-value < 0.00001

In merito a ciò, sono stati individuati 11 picchi di massa differentemente espressi (tabella in Figure 22 e 23).

I picchi 8042 e 6239 m/z individuati nei gruppi ES-OSCC e HS, erano più espressi (con un fold-increase rispettivamente di 2.7 e 2.5) nel gruppo ES-OSCC rispetto a quello LS-OSCC (Figure 22 e 23). Tutti i pazienti affetti da OSCC in questo studio sono stati classificati anche in funzione dell'interessamento linfonodale (23 casi OSCC N+ e 22 N-). Anche in questo caso, sono stati analizzati e valutati i profili proteomici ottenuti, al fine di determinare dei possibili

markers associabili alla presenza e assenza di metastasi linfonodali. Tra i due gruppi, sono stati individuati 9 picchi di massa con una differente significatività ($p < 0.05$) (Tabella 15).

Tabella 15 Picchi di massa individuate in campioni salivari di pazienti affetti da OSCC con e senza metastasi linfonodali, determinati con Q10 chips (Mann-Whitney test, level of significance: $p < 0.05$)

| | Mass | p-value | ROC | Trend in OSCC N+ | Fold change |
|---|-------|---------|---------------------|------------------|-------------|
| 1 | 8041 | < 0.01 | 0.7134387351778656 | Reduced | -2.41 |
| 2 | 7306 | < 0.01 | 0.7312252964426877 | Reduced | -1.91 |
| 3 | 6145 | < 0.05 | 0.6956521739130436 | Reduced | -1.6 |
| 4 | 13800 | < 0.05 | 0.6956521739130436 | Reduced | -2.28 |
| 5 | 6235 | < 0.05 | 0.6600790513833993 | Reduced | -2.15 |
| 6 | 6077 | < 0.05 | 0.6778656126482214 | Reduced | -1.8 |
| 7 | 6316 | < 0.05 | 0.6600790513833993 | Reduced | -1.44 |
| 8 | 6340 | < 0.05 | 0.6600790513833993 | Reduced | -2 |
| 9 | 4783 | < 0.05 | 0.32213438735177863 | Increased | 1.75 |

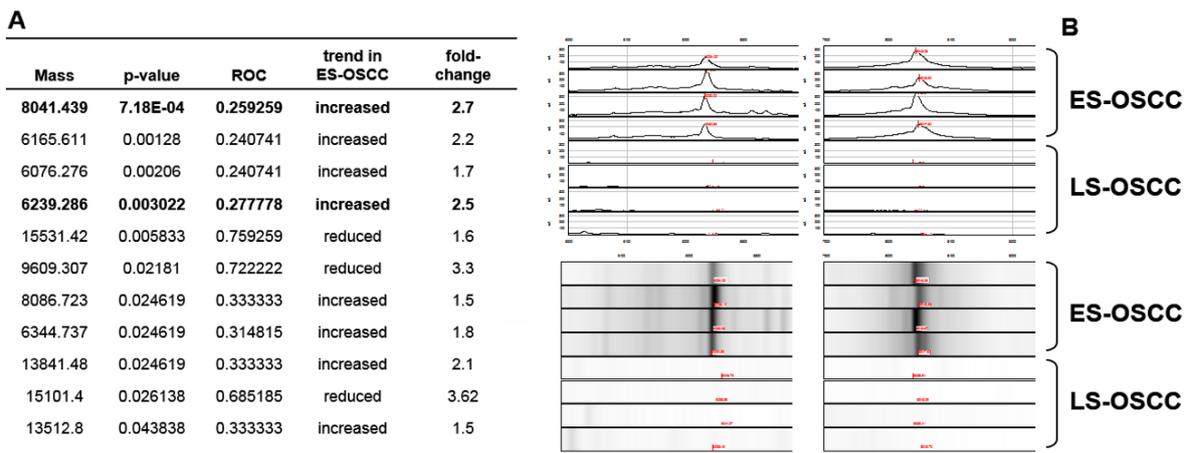


Figura 22

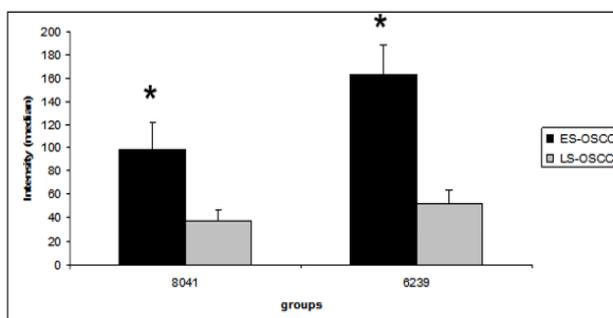


Figura 23

Da questi dati, è emerso che il picco 8041 m/z è inversamente correlato alla presenza di metastasi linfonodali.

Per l'analisi multivariata (CART), i campioni dei gruppi ES-OSCC e HS sono stati divisi in: training set (13 ES-OSCC e 18 HS) e testing set (5 ES-OSCC e 9 HS).

L'albero di classificazione più accurato ottenuto nel training set, era basato su un unico picco di 8041 m/z e consentiva di classificare correttamente il 100% dei pazienti inclusi nel gruppo ES-OSCC e HS (Figura 24). Il potere diagnostico del test veniva confermato nel testing set indipendente confermando le potenzialità del peptide come vero biomarcatore di OSCC.

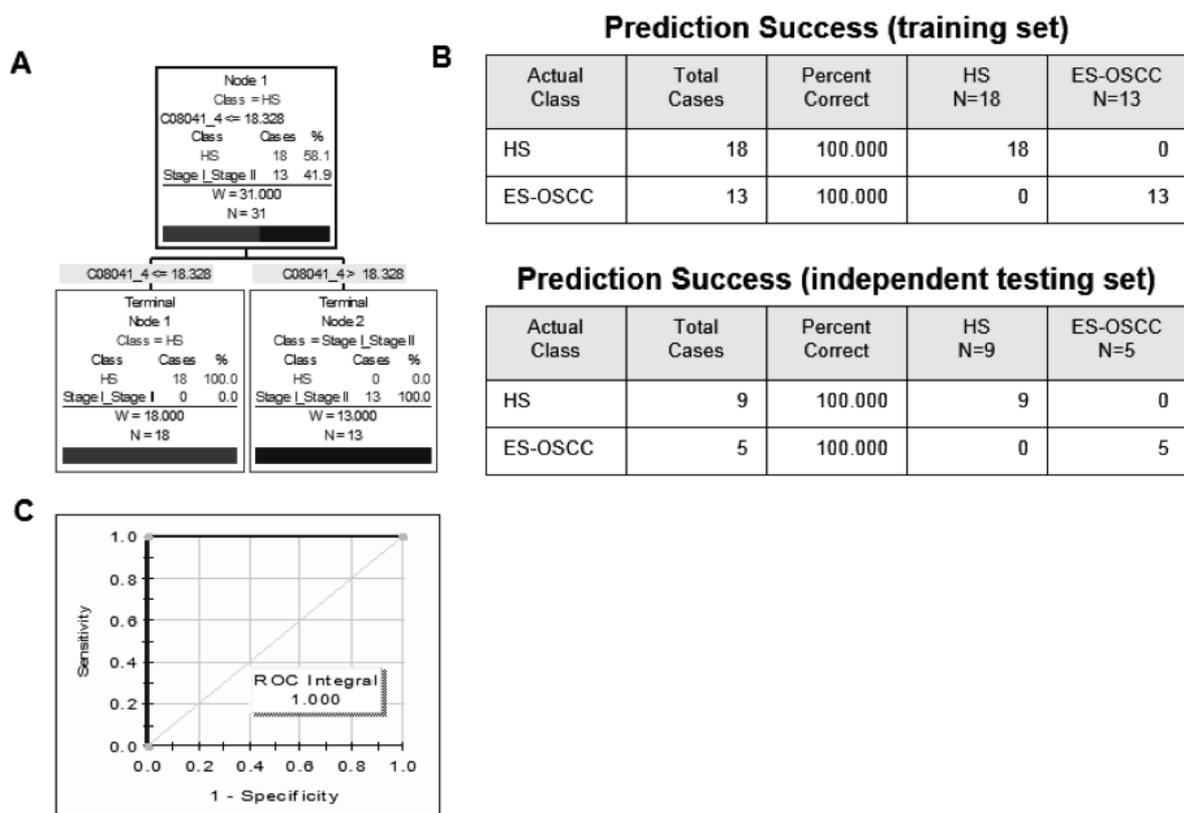


Figura 24

Al fine di identificare il marcatore d'interesse, pool di proteine di pazienti OSCC e di CTRL, precedentemente sottoposti a frazionamento con filtri Amicon® Ultra, sono stati analizzati in duplicato SELDI-TOF, con lo stesso proteinchip utilizzato nello screening iniziale di tutti i campioni. Questa analisi ha permesso di identificare nella frazione > 30KDa la maggior parte di picchi (compreso il predittore principale di 8041 m/z) strettamente associati al gruppo ES-OSCC e, quindi, potenzialmente correlati con la patologia. La frazione > 30 KDa è stata successivamente analizzata mediante elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) in gel di

poliacrilammide al 16% (Figura 25).

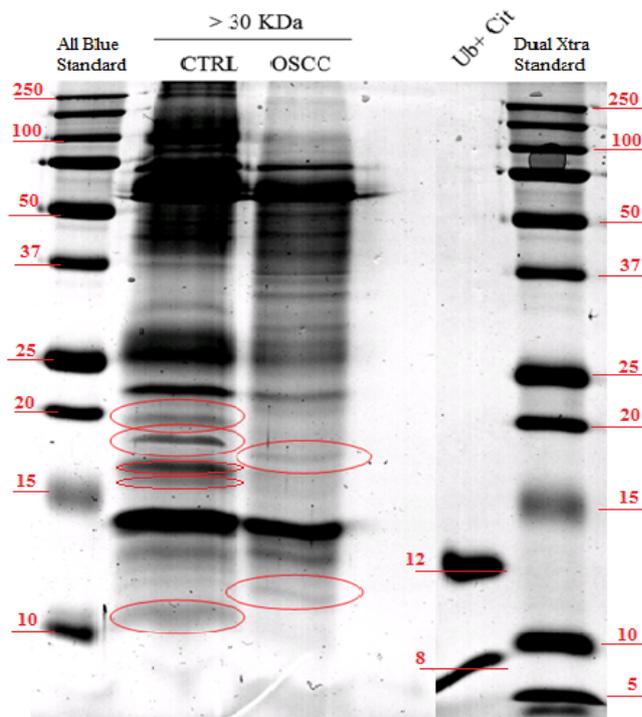


Figura 25

Da questa separazione, sono emerse bande discriminanti tra i due campioni analizzati. Tuttavia, data la complessità del campione proteico, non è stato possibile in queste condizioni risalire in modo inequivocabile all'identità delle proteine di interesse. Per tale motivo si è proceduto alla separazione delle proteine anche mediante elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE).

In quest'ultimo esperimento, sono stati individuati degli spot evidenti nel pool OSCC ma non presenti nel pool CTRL (Figura 26).

Tali spot cadevano in un range di massa (8-12 KDa) potenzialmente sovrapponibile a quello nel quale, con analisi SELDI, erano stati identificati i migliori predittori del fenotipo

neoplastico. Per tale motivo, essi sono stati escissi dal gel di poliacrilammide, digeriti con tripsina e analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF/MS.

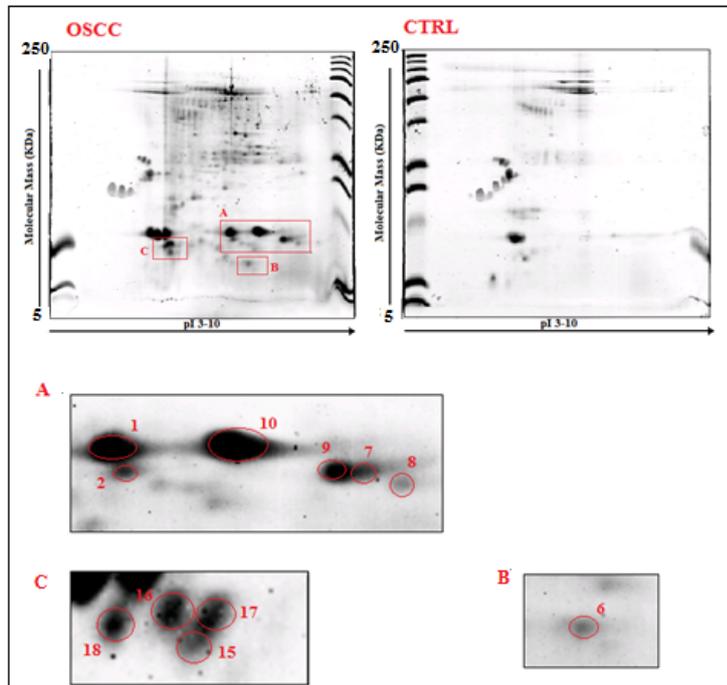


Figura 26 2D PAGE pool OSCC e pool CTRL. Ingrandimenti spot presenti sul pool OSCC (A)(B)(C)

L'analisi MS e MS/MS dei digeriti triptici ha consentito di identificare gli spot d'interesse come: cistatina SN (spot 1-2-6-7-8-9-10), cistatina S (spot 15-16-18), cistatina SA (spot 17).

Nella Figura 28 è mostrato un esempio di picco di massa e lo score associato che hanno permesso di identificare, con una significatività di $p < 0.05$, la

proteina associata in questo caso allo spot 1. Nella Tabella 17 sono riportate le proteine associate agli spot analizzati, i rispettivi peptidi assegnati con la loro rispettiva massa (m/z), i peptidi unici (U) e la significatività ($p < 0.05$ o n.s.).

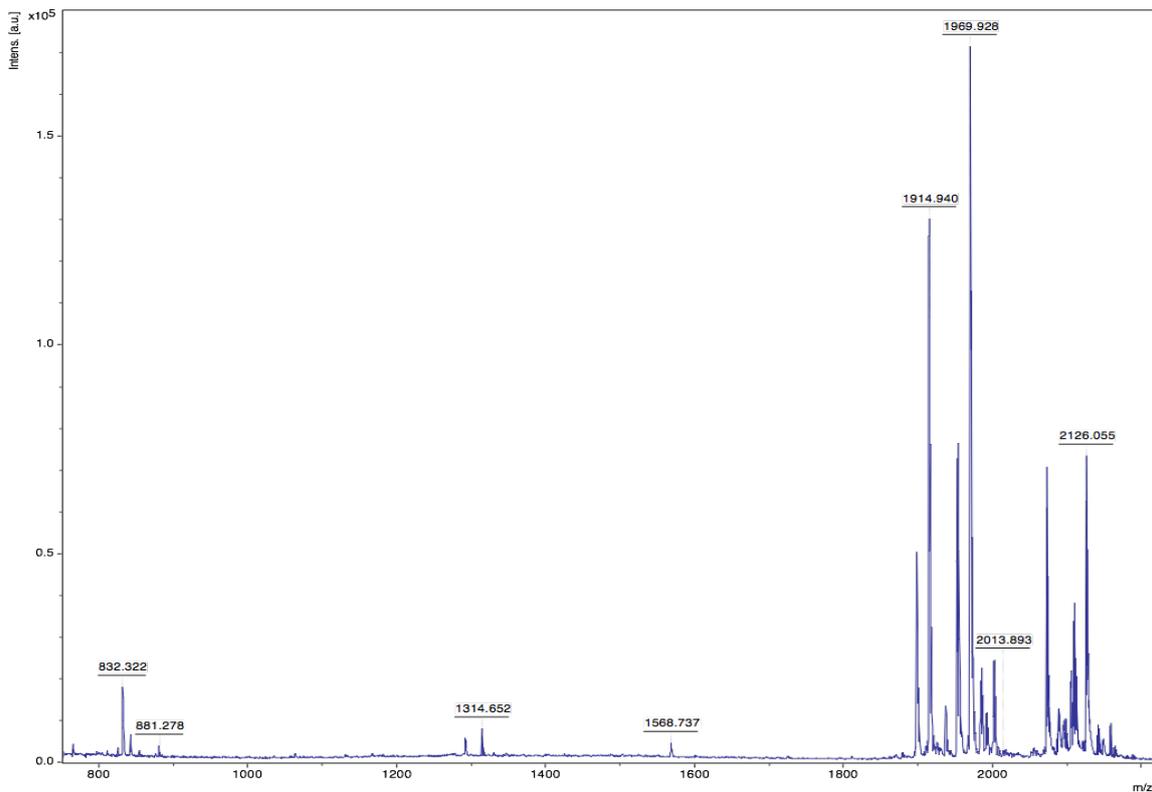


Figura 27

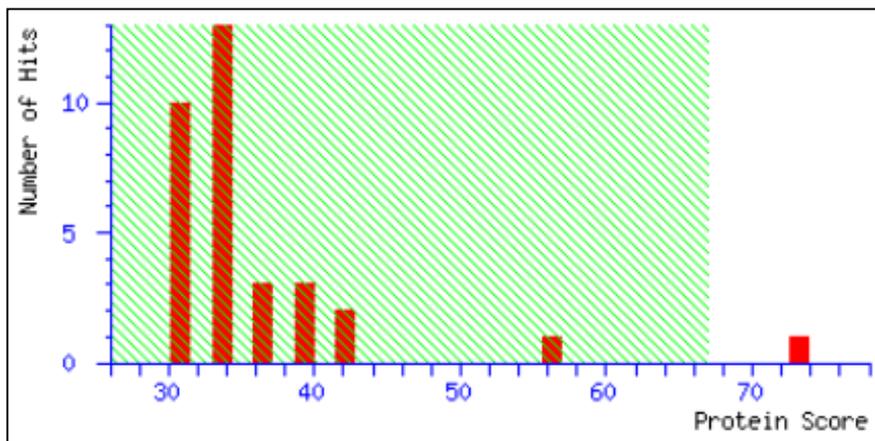


Figura 28 Picco di m/z ottenuto dall'analisi MALDI dello spot 1. In basso, il grafico dello score ottenuto da MASCOT, che permette di associare con un'alta significatività lo spot 1 alla proteina cistatina SN

Tabella 17 Proteine identificate per ciascun spot, peptidi associati alla proteina identificata con valore di massa, peptidi unici (U) e significatività (alta = $p < 0.05$ e n.s.= non significativa). In rosso sono indicati gli spot con più alta associazione alla proteina identificata

| Spot | Protein ID | Peptidi assegnati | Massa osservata (m/z) | Peptidi unici (U) | Significativita' |
|------|-------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| 1 | Cystatin SN | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A; | 2073,0536 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.ALHFAISEYNK.A | 1292,6609 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.DDYR.R | 731,3037 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,9401 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,0123 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,9281 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,0552 | no | $p < 0.05$ |
| 2 | Cystatin SN | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,0515 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,9369 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.TICK.S | 2518,2749 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,01 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,9186 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,0222 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.RSLVK.S | 602,3688 | no | $p < 0.05$ |
| 6 | Cystatin SN | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,954 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,0515 | si | $p < 0.05$ |
| 7 | Cystatin SN | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1915,0153 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,1288 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,0846 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,992 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,1138 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.RSLVK.S | 602,3757 | no | $p < 0.05$ |
| 8 | Cystatin SN | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,0459 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,941 | si | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.TICK.S | 2518,2443 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,0035 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,9234 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,0267 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.RSLVK.S | 602,3757 | no | $p < 0.05$ |
| 9 | Cystatin SN | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,0897 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.DDYR.R | 731,3173 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,9574 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,0483 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,9507 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,0878 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.RSLVK.S | 602,3757 | no | $p < 0.05$ |
| 10 | Cystatin SN | R.IIPGGIYNADLNDEWVQR.A | 2073,113 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.DDYR.R | 731,3167 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.QQTVGGVNYFFDVEVGR.T | 1914,9708 | si | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 2098,0583 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENR.R | 1969,9755 | no | $p < 0.05$ |
| | | K.KQLCSFEIYVPWENRR.S | 2126,1571 | no | $p < 0.05$ |
| | | R.RSLVK.S | 602,423 | no | $p < 0.05$ |
| 15 | Cystatin S | R.IIPGGIYDADLNDEWVQR.A | 2074,048 | si | n.s. |
| | | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.T | 1963,9426 | no | n.s. |
| | | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.TICK.S | 2567,2712 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFEIYVPWEDR.M | 1970,9199 | no | n.s. |
| | | R.IIPGGIYDADLNDEWVQR.A | 2074,0561 | si | n.s. |
| 16 | Cystatin S | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.T | 1963,9475 | no | n.s. |
| | | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.TICK.S | 2567,3106 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFEIYVPWEDR.M | 2099,0223 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFEIYVPWEDR.M | 1970,9318 | no | n.s. |
| | | R.IIPGGIYDADLNDEWVQR.A | 2074,0637 | no | n.s. |
| 17 | Cystatin SA | R.ALHFAISEYNK.A | 1320,6996 | no | n.s. |
| | | R.AREQIVGGVNYFFDIEVGR.T | 2169,1436 | no | n.s. |
| | | R.EQIVGGVNYFFDIEVGR.T | 1942,0076 | no | n.s. |
| | | R.EQIVGGVNYFFDIEVGR.TICK.S | 2545,3645 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFQIYVPWEDR.M | 2098,0353 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFQIYVPWEDR.M | 1969,949 | no | n.s. |
| | | R.IIPGGIYDADLNDEWVQR.A | 2074,0637 | no | n.s. |
| 18 | Cystatin S | R.RPLQVLR.A | 881,5929 | no | n.s. |
| | | R.AREQTFGGVNYFFDVEVGR.T | 2191,0958 | no | n.s. |
| | | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.T | 1963,9527 | no | n.s. |
| | | R.EQTFGGVNYFFDVEVGR.TICK.S | 2567,2838 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFEIYVPWEDR.M | 2099,0328 | no | n.s. |
| | | K.KQLCSFEIYVPWEDR.M | 1970,9387 | no | n.s. |
| | | R.IIPGGIYDADLNDEWVQR.A | 2074,0637 | no | n.s. |

Considerando i dati presenti in letteratura, abbiamo inoltre deciso di valutare l'espressione della survivina nella saliva dei pazienti con diagnosi accertata di carcinoma orale.

I risultati ottenuti sono riportanti nell'istogramma in Figura 29.

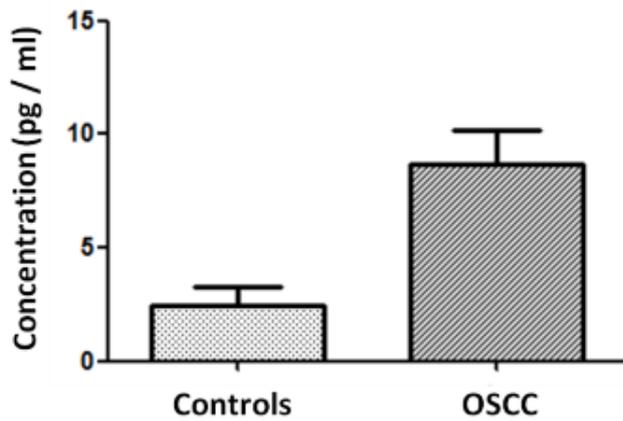


Figura 29

I livelli di Survivina nei pazienti affetti da OSCC sono risultati aumentanti rispetto ai controlli sani. Inoltre la concentrazione di tale proteina risultava aumentata nei pazienti in stadio avanzato (III e IV) rispetto ai controlli sani. I risultati ottenuti sono coerenti con i dati già presenti in letteratura.

7. Discussione

Con il presente studio possiamo confermare che la saliva umana contiene varie sostanze che possono fornire informazioni utili nella sorveglianza dello stato di salute, la patogenesi di alcune malattie e la salute del cavo orale. I costituenti più importanti della saliva sono le proteine. Per questo motivo, l'analisi completa e la piena identificazione del proteoma salivare umano sono i primi passi verso la scoperta di nuove biomolecole associate allo stato di salute o malattia. È emerso che la saliva ha alcuni svantaggi come materiale diagnostico, per esempio la composizione della saliva può essere influenzata dal metodo di raccolta e dal grado di stimolazione del flusso salivare e contiene analiti a concentrazioni 1000 volte più basse che nel plasma, per cui sono necessari sistemi di rilevamento molto sensibili per definire l'utilità della saliva come materiale diagnostico. Per tali motivi, il SELDI-TOF/MS Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry), nato dalla combinazione di MALDI-TOF/MS e cromatografia della superficie, che ha acquisito un ruolo importante per l'analisi proteica negli ultimi anni, può essere indicato per lo studio della saliva.

Il SELDI-TOF/MS si è dimostrato una tecnica ad alta efficienza particolarmente adatta per lo studio di piccoli peptidi e proteine con una sensibilità dell'ordine di femtomoli, che può essere complementare alla analisi elettroforetica bidimensionale.

Diversi gruppi di ricerca hanno mostrato interesse nella tecnica SELDI e il suo uso nello studio del proteoma salivare. In letteratura ci sono diversi articoli che mostrano l'importante potenziale ruolo del SELDI nell'analisi salivare al fine di cercare potenziali biomarker.

Nell'anno 2006, Streckfus et al. hanno identificato nei campioni di saliva di donne con tumore al seno la presenza di proteine al 18,113,170,228 e 287 km/z range usando l'analisi SELDI e

supposto che queste proteine potessero essere possibili biomarkers efficaci di tumore al seno nella saliva [90]

Nel 2007 Harthoorn et al. hanno indagato il proteoma salivare usando SELDI-TOF_MS in relazione alla sazietà e al Body Mass Index (BMI) negli umani fornendo un metodo di profilazione valutabile e non invasivo che permettesse la caratterizzazione di nuovi e differentemente espressi peptidi e proteine che possono essere usate come biomarker di sazietà e sovrappeso.[91]

Nel 2007 Imanguli et al. hanno valutato i cambiamenti proteici salivari che avvengono tramite Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HCT) in 41 sottoposti allo-HCT tramite spettrometria di massa SELDI-TOF che riportavano significativi aumenti e diminuzioni in multiple proteine salivari. [92]

Nel 2007 Shipper et al. hanno realizzato 2 studi sulla possibilità della tecnica SELDI nello studio del proteoma e le procedure corrette necessarie nel trattamento dei campioni di saliva. [85, 93]

Nel 2008 Esser et al. hanno usato questa tecnica per studiare il proteoma salivare in soggetti sani rivelando 218 proteine delle quali 84 possono essere trovate anche nel plasma sanguigno [94]. Basandosi su un confronto con altri 7 studi proteomici sulla saliva intera hanno identificato 83 nuove proteine salivari. Nel 2008 Papale et al. [85] hanno definito un protocollo che migliora la qualità e la riproducibilità dell'analisi SELDI-TOF/MS.

Nel 2009 Sun et al.[95] hanno studiato il proteoma salivare con SELDI individuando nuovi potenziali biomarkers salivari utili nella diagnosi precoce di tumore orale e previsione di trasformazione da leucoplachia a tumore orale e metastasi. In questo studio, i pattern

differenziati tra OSCC e persone sane consisteva di 4 picchi biomarker di 5797, 2902, 3883, 4951 (massa/carica) con una sensibilità di 88,24% e specificità di 93,33%. I pattern differenziati tra OSCC e leucoplachia consistevano di tre picchi di biomarker di 5818, 4617 e 3884 con sensibilità di 100% e specificità del 100%. Il pattern differenziato tra OSCC e tumore orale con metastasi locali consisteva di tre picchi biomarker di 55 809 e 4383 (massa/carica) con sensibilità del 94.12% e specificità del 85.71%.

Inoltre nel 2010 Shintany et al. hanno studiato anche il proteoma salivare di pazienti con OSCC usando l'analisi SELDI; questa analisi ha rivelato 26 proteine con livelli di espressione significativamente differenti e, in particolare, è stata identificata una cistatina troncata SA-I, con la delezione di tre amminoacidi dall'a-terminale [96].

Nel 2011 He et al. hanno dimostrato differenti pattern proteici nel siero, saliva e tessuti tra pazienti con OSCC o tessuti OSCC e OLK con tecnologie SELDI-TOF-MS. [97]

Una attenta analisi della letteratura mostra che negli ultimi anni alcuni gruppi di ricerca hanno studiato il proteoma salivare con SELDI-TOF/MS e sono stati tutti in grado di individuare potenziali biomarkers per: fibromialgia, modificazioni proteomiche associate alla parodontite in pazienti obesi, stomatiti dentali, sindrome di Sjogren primaria, complicanze post-trapianto incluse infezioni e GVHD.

Altri studi sul proteoma salivare sono state realizzati usando la tecnologia SELDI al fine di valutare le modificazioni della mucosa orale e i cambiamenti ossei che si verificano in pazienti in trattamento ortodontico o l'influenza di soluzioni di sodio-cloriti e saccarosio sulla presenza di proteine nel M(r) range 2-20kDa nella saliva intera mostrando che la stimolazione orale con differenti stimolatori del gusto colpisce la composizione proteica salivare in un modo proteine

e stimoli dipendente, che sembra non essere associato ad alcun specifico tessuto o ghiandola di origine.

La tecnologia SELDI combina la precisione dell'analisi proteomica MALDI_TOF della spettrometria di massa e la natura ad alto throughput del "protein array".

In conclusione la saliva può essere un mezzo conveniente per realizzare lo screening di un largo numero di pazienti, poichè non è invasiva, è facile da prelevare, non è costosa e riduce il rischio di infezioni crociate che caratterizza i test su sangue o siero. Inoltre è evidente che l'analisi del proteoma salivare può essere utile per identificare biomarkers diagnostici e prognostici, e che l'analisi SELDI-TOF può aiutare a migliorare questa ricerca, anche se questa analisi è attualmente considerata necessariamente complementare alla 2D-PAGE e ad aiuto/conferma all'analisi MALDI-TOF/MS.

Lo screening di OSCC ai giorni nostri dipende da un esame visuale orale del dentista o dell'otorinolaringoiatra per possibili segni o sintomi di patologia. Da qui emerge la necessità di biomarkers per migliorare la diagnosi di OSCC, anche se finora nessun marker candidato è stato approvato per l'uso clinico, principalmente a causa della loro insufficiente efficacia.

Lo studio condotto ha evidenziato quindi l'alterazione di espressione delle cistatine e della survivina nei pazienti affetti da OSCC, e una differenza nel grado di espressione nei soggetti in stadio precoce rispetto ai soggetti in stadio tardivo, definendo quindi le possibilità diagnostiche e prognostiche dell'analisi della saliva, utilizzata come metodica diagnostica non invasiva di OSCC.

7.1 Prospettive future

I biomarkers che abbiamo identificato (cistatina) e confermato (survivina) verranno confermati su casistiche più ampie mediante immunistochemica o WB su almeno 150 casi. La procedura immunistochemica sarà ottimizzata attraverso il test con differenti antigeni con metodi di rivelazione e controlli negativi. In pratica da ogni blocco di tessuto fissato in formalina incluso in paraffina, rappresentativo di ciascun caso, saranno tagliate sezioni seriate di cinque micron. Solo le sezioni che mostrano epitelio sufficiente per valutare 300 cellule saranno utilizzate. Il numero di cellule immunoreattive al reagente utilizzato sarà valutato e riportato in percentuale (almeno 300 celle per ogni caso saranno valutate) e classificato in cinque categorie: < 5%, 5-25%, 26-50%, 75-51%, > 75% in base alla positività all'anticorpo utilizzato per lo studio immunistochemico. Il prevalente pattern topografico di colorazione (di membrana, citoplasmatico, nucleare) sarà valutato separatamente. I risultati verranno espressi come percentuale di area positiva rispetto al numero totale di campi microscopici esaminati. Per alcuni reagenti, non efficienti su sezioni paraffinate, si ricorrerà al WB: piccoli frammenti di SCC orale congelato saranno preparati secondo protocolli standard. Verrà quindi utilizzato un anticorpo monoclonale o policlonale commerciale o sperimentale, adeguatamente diluito in soluzione bloccante e diretto contro la proteina bersaglio.

Tutti i dati sperimentali ottenuti saranno comparati con i dati clinici posseduti, quali dimensione della lesione, presenza di metastasi e/o di recidive, sopravvivenza globale e libera da malattia con conseguente valutazione statistica.

Il progetto ci ha portato ad identificare un marker quale la cistatina e verificare l'efficacia della survivina, ma il nostro obiettivo è di individuare altri set di biomarcatori salivari per la diagnostica non invasiva dell'OSCC. Allo stesso tempo, il progetto ha aggiunto ulteriori

conoscenze al pathway della carcinogenesi, all'identificazione di nuovi geni e proteine correlate, consentendo inoltre l'identificazione di un data set di proteine salivari, utili per l'identificazione di suscettibilità individuali o di tumori con storia naturale più aggressiva o metastatizzante, e sicuramente per la diagnosi precoce del carcinoma orale unica possibilità per migliorare il decorso clinico di questa patologia.

Bibliografia

1. Lingen, M., E.M. Sturgis, and M.S. Kies, *Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management*. *Curr Opin Oncol*, 2001. **13**(3): p. 176-82.
2. Petersen, P.E., *Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective*. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2005. **33**(6): p. 397-9.
3. Wong, D.T., *Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics*. *J Am Dent Assoc*, 2006. **137**(3): p. 313-21.
4. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
5. Gillison, M.L., *Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers*. *Head Neck*, 2007. **29**(8): p. 779-92.
6. McDowell, J.D., *An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma*. *Otolaryngol Clin North Am*, 2006. **39**(2): p. 277-94.
7. Wynder, E.L. and I.J. Bross, *Aetiological factors in mouth cancer; an approach to its prevention*. *Br Med J*, 1957. **1**(5028): p. 1137-43.
8. Laronde, D.M., et al., *Oral cancer: just the facts*. *J Can Dent Assoc*, 2008. **74**(3): p. 269-72.
9. Moreno-Lopez, L.A., et al., *Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain*. *Oral Oncol*, 2000. **36**(2): p. 170-4.
10. Blot, W.J. and J.K. McLaughlin, *Passive smoking and lung cancer risk: what is the story now?* *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(19): p. 1416-7.
11. Alvarez Gomez, G.J., et al., *Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Department of Sucre, Colombia*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2008. **13**(1): p. E1-8.
12. Jayant, K., et al., *Quantification of the role of smoking and chewing tobacco in oral, pharyngeal, and oesophageal cancers*. *Br J Cancer*, 1977. **35**(2): p. 232-5.
13. Jafarey, N.A. and S.H. Zaidi, *Carcinoma of the oral cavity and oropharynx in Karachi (Pakistan). An appraisal*. *Trop Doct*, 1976. **6**(2): p. 63-7.
14. Castellsague, X., et al., *The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis*. *Int J Cancer*, 2004. **108**(5): p. 741-9.
15. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. *Cancer Res*, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
16. Morse, D.E., et al., *Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia*. *Cancer Causes Control*, 2007. **18**(9): p. 919-29.
17. Tramacere, I., et al., *A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: overall results and dose-risk relation*. *Oral Oncol*, 2010. **46**(7): p. 497-503.
18. Brugere, J., et al., *Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth*. *Cancer*, 1986. **57**(2): p. 391-5.
19. Graham, S., et al., *Dentition, diet, tobacco, and alcohol in the epidemiology of oral cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **59**(6): p. 1611-8.
20. Holmstrup, P., et al., *Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions*. *Oral Oncol*, 2006. **42**(5): p. 461-74.
21. Syrjanen, K.J., et al., *Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity*. *Proc Finn Dent Soc*, 1983. **79**(1): p. 1-8.
22. Cardesa, A. and A. Nadal, *Carcinoma of the head and neck in the HPV era*. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 2011. **20**(3): p. 161-73.

23. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(2): p. 467-75.
24. De Stefani, E., et al., *Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract--II. Nutrients*. *Oral Oncol*, 1999. **35**(1): p. 22-6.
25. De Stefani, E., et al., *Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract--I. Foods*. *Oral Oncol*, 1999. **35**(1): p. 17-21.
26. Jessner, W., et al., *Plummer-Vinson syndrome associated with celiac disease and complicated by postcricoid carcinoma and carcinoma of the tongue*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(5): p. 1208-9.
27. Behnoud, F., S. Torabian, and M. Zargaran, *Relationship between oral poor hygiene and broken teeth with oral tongue squamous cell carcinoma*. *Acta Med Iran*, 2011. **49**(3): p. 159-62.
28. Warnakulasuriya, S., N.W. Johnson, and I. van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa*. *J Oral Pathol Med*, 2007. **36**(10): p. 575-80.
29. Mashberg, A. and A.M. Samit, *Early detection, diagnosis, and management of oral and oropharyngeal cancer*. *CA Cancer J Clin*, 1989. **39**(2): p. 67-88.
30. Narayana, A., et al., *High-dose-rate interstitial brachytherapy in recurrent and previously irradiated head and neck cancers--preliminary results*. *Brachytherapy*, 2007. **6**(2): p. 157-63.
31. Tannock, I.F., *New perspectives in combined radiotherapy and chemotherapy treatment*. *Lung Cancer*, 1994. **10 Suppl 1**: p. S29-51.
32. Lo Muzio, L., et al., *Survivin expression in oral squamous cell carcinoma*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(12): p. 2244-8.
33. Lo Muzio, L., et al., *Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Cancer Lett*, 2005. **225**(1): p. 27-33.
34. De Maria, S., et al., *Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009. **135**(1): p. 107-16.
35. Chicharro, J.L., et al., *Saliva composition and exercise*. *Sports Med*, 1998. **26**(1): p. 17-27.
36. Pfaffe, T., et al., *Diagnostic potential of saliva: current state and future applications*. *Clin Chem*, 2011. **57**(5): p. 675-87.
37. Schantz, S.P. and G.P. Yu, *Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002. **128**(3): p. 268-74.
38. Gorr, S.U., *Antimicrobial peptides in periodontal innate defense*. *Front Oral Biol*, 2012. **15**: p. 84-98.
39. Zaka-ur-Rab, Z., et al., *Evaluation of salivary anti-Salmonella typhi lipopolysaccharide IgA ELISA for serodiagnosis of typhoid fever in children*. *Arch Dis Child*, 2012. **97**(3): p. 236-8.
40. Lee, J.M., E. Garon, and D.T. Wong, *Salivary diagnostics*. *Orthod Craniofac Res*, 2009. **12**(3): p. 206-11.
41. Smoot, L.M., et al., *DNA microarrays as salivary diagnostic tools for characterizing the oral cavity's microbial community*. *Adv Dent Res*, 2005. **18**(1): p. 6-11.
42. Bjorhall, K., T. Miliotis, and P. Davidsson, *Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples*. *Proteomics*, 2005. **5**(1): p. 307-17.

43. Issaq, H.J., Z. Xiao, and T.D. Veenstra, *Serum and plasma proteomics*. Chem Rev, 2007. **107**(8): p. 3601-20.
44. Whiteaker, J.R., et al., *Head-to-head comparison of serum fractionation techniques*. J Proteome Res, 2007. **6**(2): p. 828-36.
45. Ramachandran, P., et al., *Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2006. **5**(6): p. 1493-503.
46. Sondej, M., et al., *Glycoprofiling of the Human Salivary Proteome*. Clin Proteomics, 2009. **5**(1): p. 52-68.
47. Larsen, M.R., et al., *Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1778-87.
48. Liu, T., et al., *Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2005. **4**(6): p. 2070-80.
49. Li, Y., et al., *The Oral Fluid MEMS/NEMS Chip (OFMNC): diagnostic and translational applications*. Adv Dent Res, 2005. **18**(1): p. 3-5.
50. Tabak, L.A., *A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics*. J Dent Educ, 2001. **65**(12): p. 1335-9.
51. Malamud, D., et al., *Point detection of pathogens in oral samples*. Adv Dent Res, 2005. **18**(1): p. 12-6.
52. Streckfus, C. and L. Bigler, *The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study*. Adv Dent Res, 2005. **18**(1): p. 17-24.
53. Koenig, W., *High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: From improved risk prediction to risk-guided therapy*. Int J Cardiol, 2013.
54. Foley, J.D., 3rd, et al., *Salivary biomarkers associated with myocardial necrosis: results from an alcohol septal ablation model*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012. **114**(5): p. 616-23.
55. Thorman, R., et al., *Inflammatory cytokines in saliva: early signs of metabolic disorders in chronic kidney disease. A controlled cross-sectional study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010. **110**(5): p. 597-604.
56. Border, M.B., et al., *Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes*. Mol Biosyst, 2012. **8**(4): p. 1304-10.
57. Cabras, T., et al., *Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(10): p. 2099-108.
58. Kaneda, Y., et al., *Localization of antimicrobial peptides human beta-defensins in minor salivary glands with Sjogren's syndrome*. Eur J Oral Sci, 2009. **117**(5): p. 506-10.
59. Rathnayake, N., et al., *Salivary biomarkers for detection of systemic diseases*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61356.
60. Floriano, P.N., et al., *Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study*. Clin Chem, 2009. **55**(8): p. 1530-8.
61. Meurman, J.H., *Infectious and dietary risk factors of oral cancer*. Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 411-3.
62. Walt, D.R., et al., *Microsensor arrays for saliva diagnostics*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1098**: p. 389-400.
63. Savica, V., et al., *Salivary phosphate secretion in chronic kidney disease*. J Ren Nutr, 2008. **18**(1): p. 87-90.
64. Savica, V., et al., *A new approach to the evaluation of hyperphosphatemia in chronic kidney disease*. Clin Nephrol, 2007. **68**(4): p. 216-21.
65. Rao, P.V., et al., *Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 239-45.

66. Kardesler, L., et al., *Crevicular fluid matrix metalloproteinase-8, -13, and TIMP-1 levels in type 2 diabetics*. Oral Dis, 2010. **16**(5): p. 476-81.
67. Hardy, D.C., et al., *Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease*. J Clin Periodontol, 2012. **39**(3): p. 249-55.
68. Wagsater, D., et al., *MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse*. Int J Mol Med, 2011. **28**(2): p. 247-53.
69. Djuric, T., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with carotid atherosclerosis*. J Clin Lab Anal, 2010. **24**(4): p. 246-51.
70. Pradhan-Palikhe, P., et al., *Elevated MMP-8 and decreased myeloperoxidase concentrations associate significantly with the risk for peripheral atherosclerosis disease and abdominal aortic aneurysm*. Scand J Immunol, 2010. **72**(2): p. 150-7.
71. Qvarnstrom, M., et al., *Salivary lysozyme and prevalent hypertension*. J Dent Res, 2008. **87**(5): p. 480-4.
72. Qvarnstrom, M., et al., *Association of salivary lysozyme and C-reactive protein with metabolic syndrome*. J Clin Periodontol, 2010. **37**(9): p. 805-11.
73. Tonetti, M.S., *Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials*. J Clin Periodontol, 2009. **36 Suppl 10**: p. 15-9.
74. Miller, C.S., et al., *Current developments in salivary diagnostics*. Biomark Med, 2010. **4**(1): p. 171-89.
75. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2007*. CA Cancer J Clin, 2007. **57**(1): p. 43-66.
76. Zhang, L., et al., *Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 949-57 e1-7.
77. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2004*. CA Cancer J Clin, 2004. **54**(1): p. 8-29.
78. Turan, T., et al., *Free and total prostate-specific antigen levels in saliva and the comparison with serum levels in men*. Eur Urol, 2000. **38**(5): p. 550-4.
79. Streckfus, C., et al., *The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(6): p. 2363-70.
80. Gallo, C., et al., *Potential Salivary Proteomic Markers of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. **13**(1): p. 55-61.
81. Wu, J.Y., et al., *Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2010. **46**(4): p. 226-31.
82. Al-Tarawneh, S.K. and S. Bencharit, [Not Available]. Open Dent J, 2009. **3**: p. 74-9.
83. Wong, D.T., *Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance'*. Expert Rev Mol Diagn, 2006. **6**(3): p. 267-72.
84. Choo, R.E. and M.A. Huestis, *Oral fluid as a diagnostic tool*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(11): p. 1273-87.
85. Papale, M., et al., *Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF/MS): from sample collection to data analysis*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(1): p. 89-99.
86. Navazesh, M., *Methods for collecting saliva*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **694**: p. 72-7.
87. Dawes, C., *Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition*. J Physiol, 1972. **220**(3): p. 529-45.
88. Koomen, J.M., et al., *Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery*. J Proteome Res, 2005. **4**(3): p. 972-81.

89. Arellano-Garcia, M.E., et al., *Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva*. Oral Dis, 2008. **14**(8): p. 705-12.
90. Streckfus, C.F., L.R. Bigler, and M. Zwick, *The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study*. J Oral Pathol Med, 2006. **35**(5): p. 292-300.
91. Harthoorn, L.F., et al., *Salivary biomarkers associated with perceived satiety and body mass in humans*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(12): p. 1637-50.
92. Imanguli, M.M., et al., *Changes in salivary proteome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Exp Hematol, 2007. **35**(2): p. 184-92.
93. Papale, M., et al., *Urine profiling by SELDI-TOF/MS: monitoring of the critical steps in sample collection, handling and analysis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **856**(1-2): p. 205-13.
94. Esser, D., et al., *Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid*. Biomark Insights, 2008. **3**: p. 25-27.
95. Sun, G. and F.Y. Ping, *[Application of saliva protein fingerprints in the diagnosis of oral squamous cell cancer by surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass]*. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2009. **44**(11): p. 664-7.
96. Shintani, S., et al., *Identification of a truncated cystatin SA-I as a saliva biomarker for oral squamous cell carcinoma using the SELDI ProteinChip platform*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010. **39**(1): p. 68-74.
97. He, H., et al., *A new and preliminary three-dimensional perspective: proteomes of optimization between OSCC and OLK*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2011. **39**(1): p. 26-30.