



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cliniche, Specialistiche e
Odontostomatologiche

Corso di Dottorato di Ricerca in Biomedical Sciences

XXXV Ciclo

**ANALISI MORFOLOGICA E MORFOMETRICA DELLO
STROMA TUMORALE CON MICROSCOPIA OTTICA E
MICROTOMOGRFIA A LUCE DI SINCROTRONE NEL
CARCINOMA SQUAMOCELLULARE ORALE**

Tutor: Chiar.mo

Prof. Andrea Santarelli

Tesi di Dottorato di:

Lucrezia Togni

A. A. 2019 - 2022

Indice

1. Il carcinoma squamocellulare orale	p. 1
1.1. Epidemiologia del carcinoma orale	p. 1
1.2. Fattori di rischio del carcinoma orale	p. 8
1.3. Caratteristiche cliniche del carcinoma orale	p. 14
1.4. Istopatologia del carcinoma orale	p. 18
1.5. Stadiazione del carcinoma orale	p. 19
1.6. Fattori prognostici raccomandati per la gestione clinica del carcinoma orale	p. 22
2. Lo stroma connettivale	p. 27
2.1. Caratteristiche dello stroma connettivale fisiologico	p. 27
2.2. Caratteristiche dello stroma connettivale tumorale	p. 31
2.3. Ruolo dello stroma tumorale nella progressione neoplastica di malattia	p. 33
2.4. Ruolo dello stroma tumorale nel carcinoma orale	p. 36
3. I fattori morfologici emergenti per lo studio dello stroma tumorale nel carcinoma orale	p.38
3.1. Tumor Budding	p. 38
3.2. Tumor Stroma Ratio	p. 39
3.3. Immunofenotipo	p. 40
4. Scopo del lavoro	p. 43
5. Materiali e metodi	p. 44
5.1. Selezione dei campioni chirurgici per l'analisi istopatologica	p. 44
5.2. Analisi istopatologica	p. 46
5.3. Selezione dei campioni chirurgici per l'analisi di microtomografia a luce di sincrotrone	p. 56
5.4. Principi fisici della microtomografia ad alta risoluzione a contrasto di fase	p. 56
5.5. Analisi di microtomografia ad alta risoluzione a luce di sincrotrone	p. 59
5.6. Outcome clinici	p. 61
5.7. Analisi statistica	p. 61
5.8. Analisi del rischio	p. 62

6. Risultati	p. 63
6.1. Caratteristiche clinico-patologiche dei casi sottoposti ad indagine di microscopia ottica	p. 63
6.2. Analisi di correlazione e di sopravvivenza dell'indagine di microscopia ottica	p. 70
6.3. Caratteristiche clinico-patologiche dei casi sottoposti a microtomografia a luce di sincrotrone	p. 91
6.4. Acquisizione delle immagini ed estrazione dei dati volumetrici	p.93
6.5. Analisi della varianza degli indici strutturali dello stroma tumorale	p.102
6.6. Analisi di correlazione fra gli indici strutturali dello stroma tumorale	p.106
6.7. Analisi di correlazione fra gli indici strutturali dello stroma tumorale e le caratteristiche clinico-patologiche dei casi	p.110
7. Discussione	p.118
8. Conclusioni	p.133
9. Bibliografia	p.135

1. IL CARCINOMA QUAMOCELLULARE ORALE

1.1. EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA ORALE

Il carcinoma squamocellulare orale (OSCC) è il tumore maligno più frequente del distretto testa-collo, rappresentando circa il 30% di tali neoplasie, e del cavo orale, costituendo oltre il 90% dei tumori maligni [1, 2]. Esso origina dall'epitelio di rivestimento e può insorgere in qualsiasi sito del cavo orale nella forma di un'ulcera, di un nodulo più o meno duro alla palpazione, oppure come una lesione esofitica [3].

I dati epidemiologici indicano come questa sia una patologia tutt'altro che rara, rappresentando l'undicesima forma di cancro più comune al mondo ed essendo per incidenza all'ottavo e al terzo posto rispettivamente nei Paesi sviluppati e nei Paesi in via di sviluppo [4].

Il progetto GLOBOCAN ha stimato 377.713 nuovi casi nel 2020 (Figura 1), un tasso di incidenza standardizzato per età pari a 4,1 nuovi casi ed un tasso di mortalità globale di 1,9 decessi ogni 100.000 abitanti per anno [5] (Figura 2).

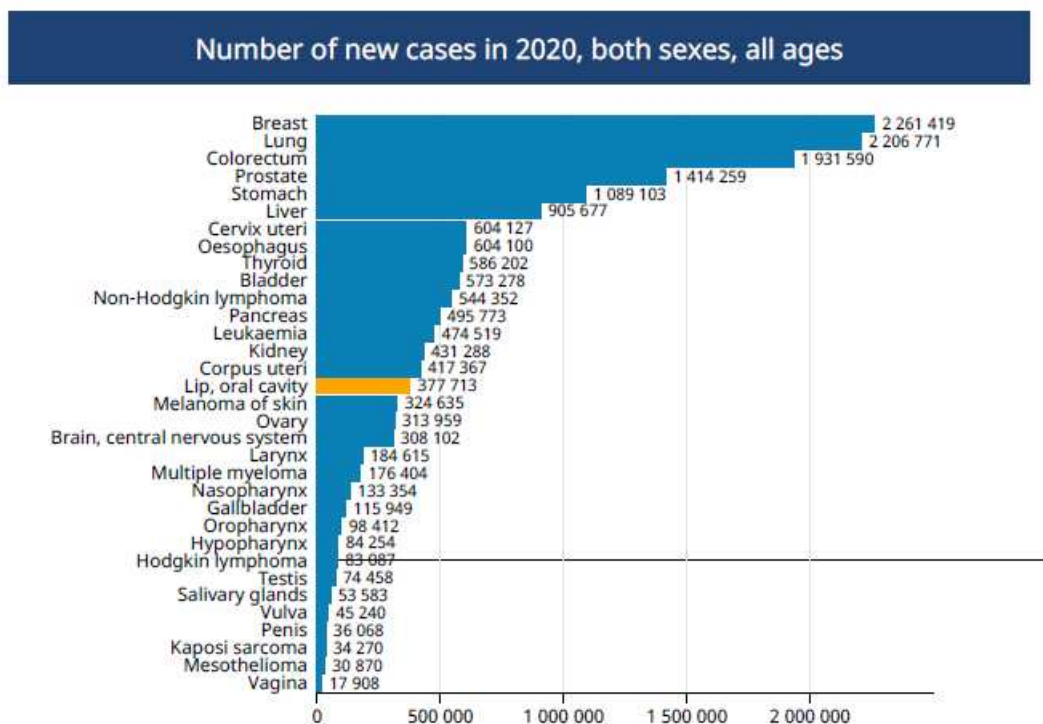


Figura 1. Numero di nuovi casi di carcinoma squamocellulare orale nel mondo. International Agency for Research on Cancer, WHO. Lip, Oral Cavity. Fonte: The Global Cancer Observatory, dicembre 2020.

Age standardized (World) incidence and mortality rates, lip, oral cavity

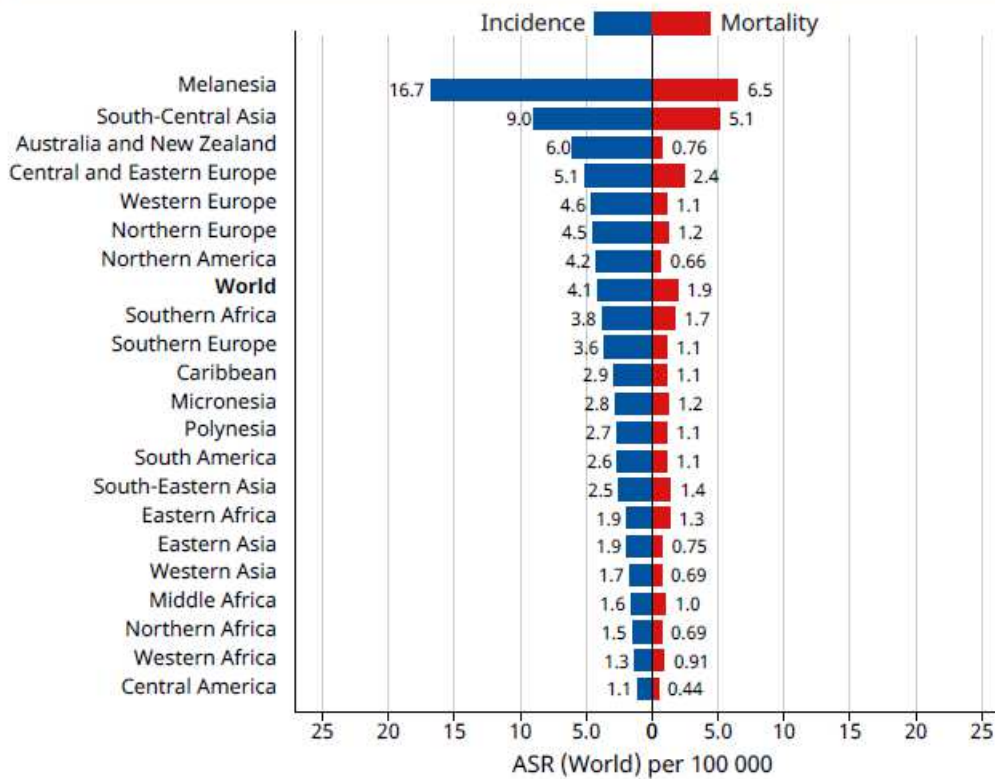


Figura 2. Tasso di incidenza e di mortalità del carcinoma squamocellulare orale standardizzato per età. International Agency for Research on Cancer, WHO. Lip, Oral Cavity. Fonte: The Global Cancer Observatory, dicembre 2020.

Nel 2022 il National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, ha calcolato 54.000 nuovi casi e 11.230 nuovi decessi (Figura 3) ed una sopravvivenza a breve termine (2012-2018) pari al 68%. Negli Stati Uniti la malattia è stata diagnosticata in 410.376 individui registrando un aumento di incidenza e di mortalità rispettivamente del 1,0% e del 0,4% annuo negli ultimi 10 anni [4].

Indipendentemente dal genere, il rischio di sviluppare un carcinoma squamocellulare orale e/o orofaringeo risulta pari al 1,2%, rispettivamente 1 caso su 60 (1,7%) per gli uomini e 1 caso su 140 (0,71%) per le donne [4].

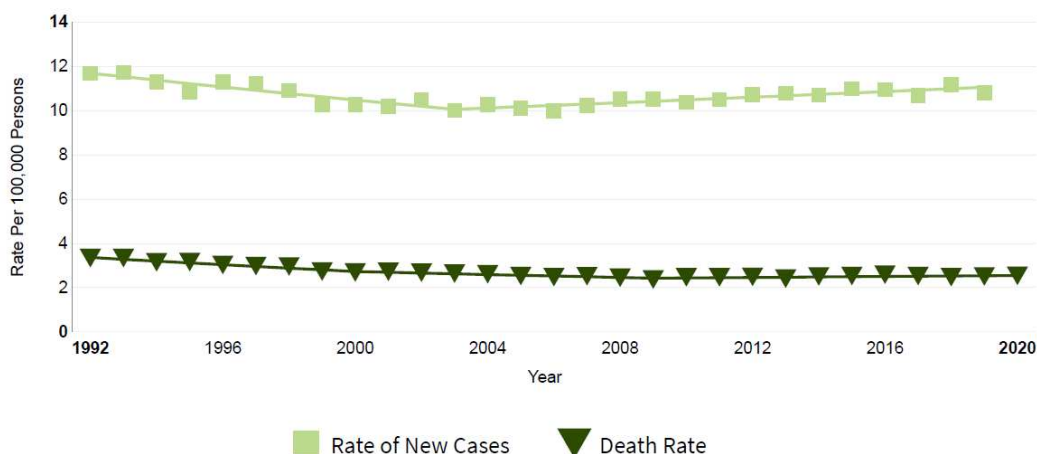


Figura 3. Tassi di nuovi casi e nuovi decessi di carcinoma squamocellulare orale standardizzati per età per 100.000 abitanti degli ultimi 30 anni. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer.

Nonostante sia da sempre considerata una neoplasia a maggior interessamento maschile, negli ultimi dieci anni il rapporto maschi/femmine si è modificato, passando da 3:1 a 2:1. Per quanto riguarda l'età di insorgenza, esso colpisce prevalentemente soggetti di età compresa fra la quinta e la sesta decade di vita [3, 6]; in particolare la percentuale di nuovi casi è massima, pari al 31%, fra i 55 ed i 64 anni di età [4]. Tuttavia, l'incidenza di casi diagnosticati al di sotto dei 45 anni sembra essere notevolmente aumentata fino a raggiungere il 6,5% dei casi sia negli USA che in Europa [7, 8]. Pertanto, oltre all'aumento dei tassi di incidenza, negli ultimi dieci anni si è verificato un abbassamento dell'età media di insorgenza ed un maggior coinvolgimento della popolazione femminile (Figura 4).

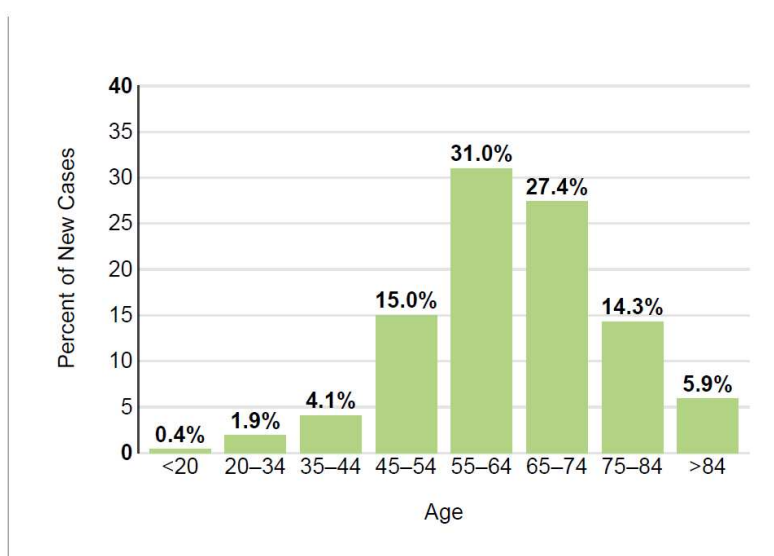


Figura 4. Percentuale di nuovi casi di carcinoma squamocellulare orale per gruppi di età. SEER 22 2015–2019. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer.

Dal punto di vista epidemiologico, specifiche regioni geografiche devono essere considerate separatamente data la marcata variazione dei tassi di incidenza e di prevalenza. In alcuni paesi del Sud Est Asiatico, come India, Pakistan, Sri Lanka, Cina e Taiwan, si registrano oltre 10 casi su 100.000 abitanti l'anno [3]. In particolare, a Taiwan il carcinoma orale rappresenta la prima causa di morte tra i giovani adulti di età compresa fra i 25 ed i 44 anni come conseguenza del progressivo aumento del consumo di foglie betel nella popolazione [9-12].

Stime elevate sono state riportate anche in alcuni Paesi dell'Europa dell'Est, dell'Europa Nord Occidentale (Ungheria, Slovacchia, Slovenia, Francia), dell'America Latina (Brasile, Uruguay), dei Caraibi (Porto Rico), ed in Nuova Papa Guinea, in relazione all'effetto combinato del consumo di alcol e delle pratiche di inalazione e masticazione di tabacco, di foglie di Betel e di noce di Areca, che favoriscono lo sviluppo di carcinomi squamocellulari orali di tipo verrucoso, specie nelle zone di mucosa a contatto con gli agenti di rischio esogeni [3].

Degno di nota, in Ungheria il carcinoma orofaringeo è considerabile la quarta neoplasia più comune per gli uomini e la sesta per le donne, con percentuali di mortalità rispettivamente pari al 83,5% e al 72,3% [13-15] (Figura 5).

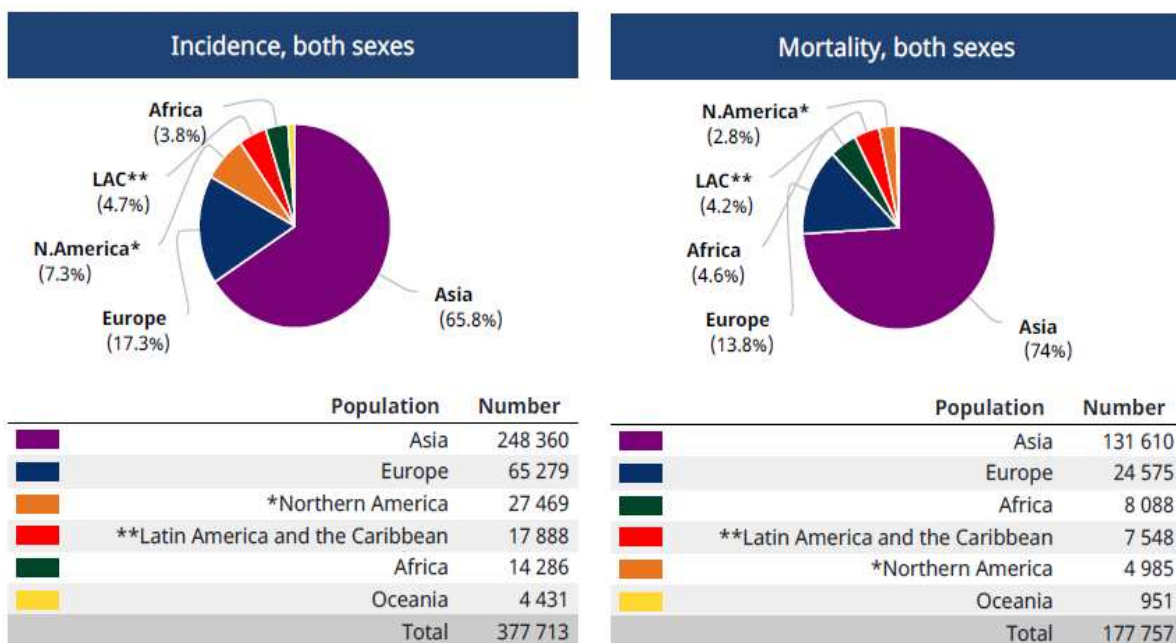


Figura 5. Incidenza e mortalità del carcinoma squamocellulare orale nei differenti paesi del mondo. International Agency for Research on Cancer, WHO. Lip, Oral Cavity. Fonte: The Global Cancer Observatory, dicembre 2020.

Il tasso di incidenza annuo, calcolato nel quadriennio 2015-2019, ed aggiustato per età è pari al 11,5% per 100.000 abitanti, rispettivamente del 17,4 per gli uomini e del 6,4 per le donne. Nella popolazione maschile, il tasso di incidenza più elevato si registra nelle popolazioni bianche non ispaniche (20,3), negli Indiani di America e fra i nativi dell'Alaska (17,7), seguiti dagli Afroamericani (13,2), gli Asiatici non ispanici (12,2) e gli Ispanici (10,4) (Figura 6). Anche nel genere femminile, le più colpite sono le donne bianche non ispaniche (7,2), seguite dalle Asiatiche (5,7), dalle Indiane di America e native dell'Alaska (5,4), dalle Afroamericane (5,0) ed infine dalle Ispaniche (4,3) [4] (Figura 7).

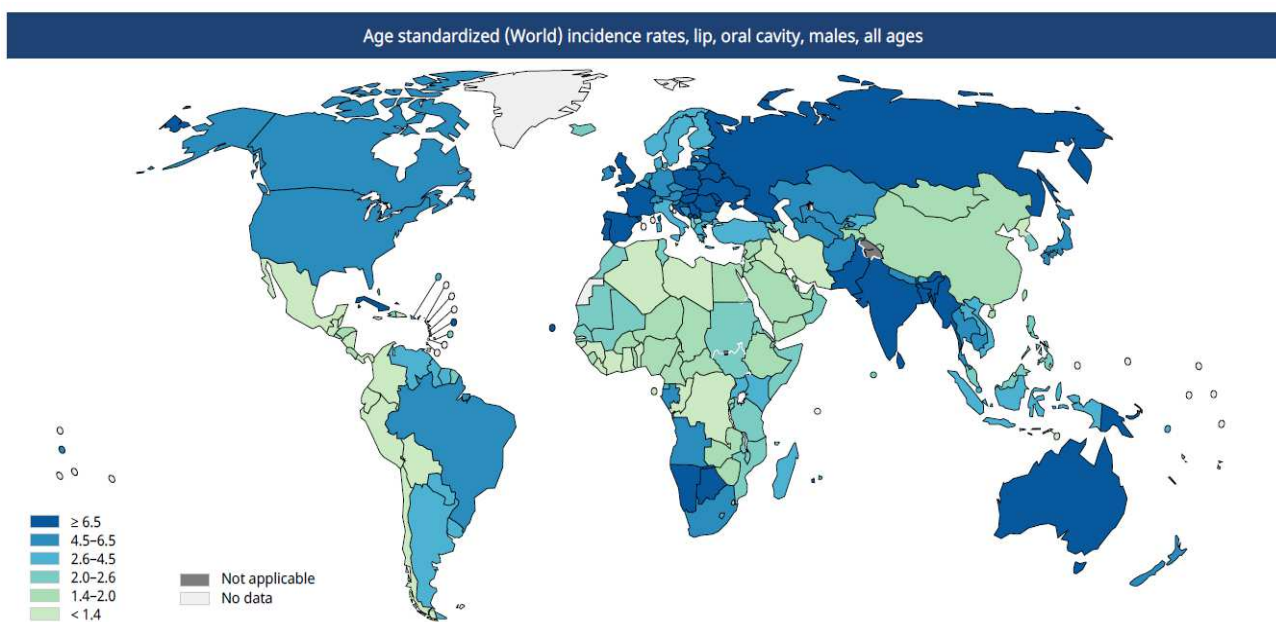


Figura 6. Tassi di incidenza di carcinoma squamocellulare orale nel genere maschile nei differenti paesi del mondo. International Agency for Research on Cancer, WHO. Lip, Oral Cavity. Fonte: The Global Cancer Observatory, dicembre 2020.

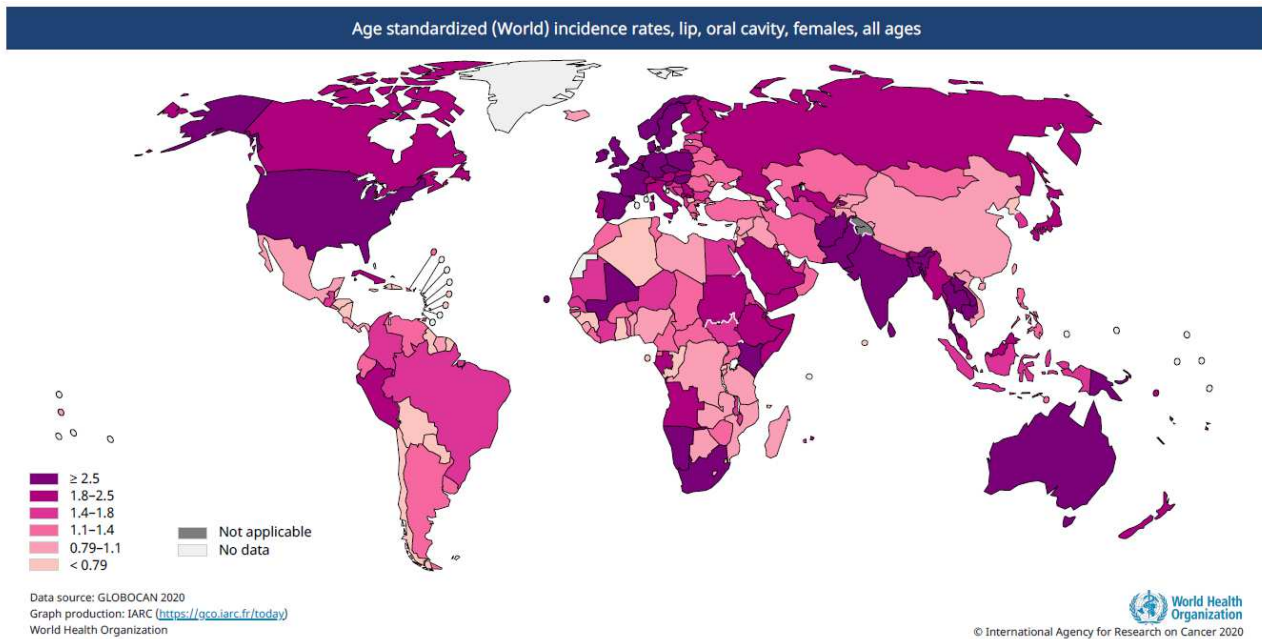


Figura 7. Tassi di incidenza di carcinoma squamocellulare orale nel genere femminile nei differenti paesi del mondo. International Agency for Research on Cancer, WHO. Lip, Oral Cavity. Fonte: The Global Cancer Observatory, dicembre 2020.

In Italia, l'incidenza media è di 8,44 nuovi casi all'anno ogni 100.000 abitanti tra gli uomini, e 2,22 tra le donne. Tassi di incidenza più elevati si registrano nelle regioni settentrionali, dove si stimano 12,1 nuovi casi ogni 100.000 abitanti per anno, rispetto a quelle centro-meridionali ed insulari. Nelle aree industrializzate, nelle valli alpine e soprattutto nelle regioni del Nord-Est di Italia, il carcinoma orale risulta ancor più diffuso, raggiungendo valori di incidenza di 14 nuovi casi ogni 100.000 abitanti di sesso maschile. Le notevoli variazioni nel nostro Paese riflettono differenze legate ad usanze locali, quali il consumo di tabacco e l'assunzione di bevande alcoliche. Tuttavia, nei registri di riferimento, i dati relativi all'Italia meridionale sono spesso incompleti con conseguente sottostima delle percentuali di incidenza. In Italia, un dato preoccupante è rappresentato dall'aumento dell'incidenza in soggetti di genere femminile con importante riduzione del rapporto maschi/femmine, sceso da 6:1 nel 1986, a 3:1 alla fine degli anni '90, fino a divenire attualmente pari a 2:1 [16].

Nel mondo il tasso di mortalità più elevato si registra nella popolazione maschile (3,9 nuovi decessi/100.000 abitanti/anno), specie negli Afroamericani (4,4), rispetto a quella femminile (1,4) dove non si stimano sensibili differenze di mortalità in base alla razza, ad eccezione delle donne ispaniche che mostrano un tasso di mortalità inferiore (0,8).

La maggior parte dei decessi (82,0%) avviene in soggetti con oltre 55 anni di età, specie in individui di età compresa fra i 65 ed i 74 anni, con un'età media al momento del decesso pari a 68 anni [4].

Negli USA, in Thailandia ed in India è stato registrato un tasso crescente di mortalità sin dagli inizi degli anni '90, mentre nella maggioranza dei paesi Europei la mortalità per tumore del cavo orale negli uomini ha avuto un sensibile aumento fra gli anni '50 e la fine degli anni '80. In particolare, in Germania ed in Ungheria è stato registrato un aumento di quattro volte del tasso di mortalità, mentre in Polonia, in Romania ed in Spagna questo è raddoppiato.

In Italia, la mortalità è di circa 3.000 individui all'anno [17]; essa è in assoluto tra le più alte ed è inspiegabilmente stabile da oltre 20 anni, contrariamente a quanto è avvenuto per altre tipologie di tumori maligni per i quali si è recentemente osservato un incremento delle percentuali di sopravvivenza.

Il National Cancer Institute ha stimato una sopravvivenza a breve termine (2012-2018) pari al 68%; variabile dall'86,3% per stadi di malattia localizzata, al 69,0% per carcinomi orali con interessamento regionale, sino al 40,4% per neoplasie con coinvolgimento di organi a distanza [4] (Figura 8). Pertanto, le terapie chirurgiche, chemioterapiche e la radioterapia, sebbene estremamente costose in termini economici e biologici, non risultano efficaci a medio-lungo termine, riducendo drasticamente l'aspettativa di vita dei pazienti in stadio avanzato di malattia.

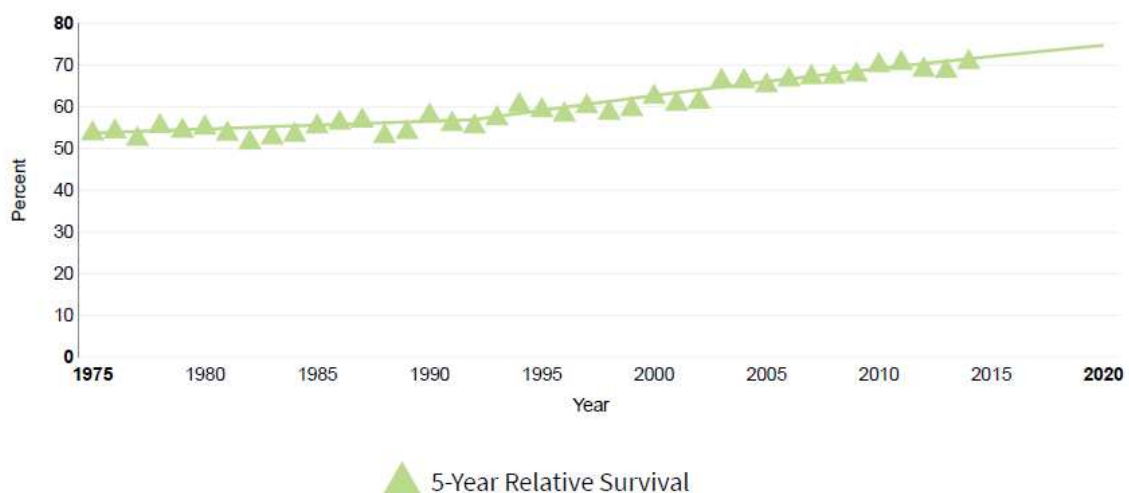


Figura 8. Percentuale di sopravvivenza a breve termine, 5 anni, del carcinoma squamocellulare orale nel mondo negli ultimi 40 anni. SEER 22 2015–2019. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer.

1.2.FATTORI DI RISCHIO DEL CARCINOMA ORALE

Il fumo di tabacco ed il consumo di bevande alcoliche rappresentano i principali fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma squamocellulare orale: si stima che circa l'80% dei casi siano dovuti a tali agenti [7] e che l'eliminazione di tabacco ed alcol comporterebbe, in Europa e negli Stati Uniti, una riduzione del 60-80% dei tassi di incidenza [18]. Evidenze scientifiche, tuttavia, suggeriscono il coinvolgimento di ulteriori fattori di rischio nei meccanismi di cancerogenesi o co-cancerogenesi orale. Tra questi ricordiamo: agenti infettivi, fattori nutrizionali e dietetici, condizioni di scarsa igiene orale, traumatismi orali cronici, radiazioni ultraviolette, stati di immunodepressione e fattori genetici.

1.2.1. Tabacco

Il fumo di tabacco viene considerato un fattore di rischio indipendente per la carcinogenesi orale. Attraverso la combustione del tabacco, delle sostanze contenute nella carta e dei loro additivi vengono liberati oltre 3.000 composti che penetrano nella mucosa orale veicolati dall'alta temperatura. È stato stimato che oltre l'80% dei soggetti affetti da carcinoma orale sono o sono stati fumatori, percentuale almeno 2-3 volte superiore rispetto alla popolazione generale [19]. Il rischio di sviluppare un carcinoma orale risulta 5-9 volte maggiore nei fumatori rispetto ai non fumatori [20] e l'associazione risulta dose-dipendente; infatti, coloro che fumano più di 20 sigarette al giorno hanno rischio due volte aumentato di sviluppare un carcinoma orale rispetto ai consumatori di meno di 20 sigarette giornaliere [21]. Inoltre, pazienti che continuano a fumare anche dopo la diagnosi e l'eventuale trattamento della neoplasia hanno un rischio sei volte aumentato di sviluppare nuovi tumori primitivi a carico delle vie aereodigestive superiori rispetto agli ex fumatori. L'azione cancerogena del tabacco è dovuta alla effetto mutageno di composti e prodotti della combustione, quali gli idrocarburi aromatici policiclici (benzopirene, benzoantracene, ecc.), le nitrosamine tabacco-specifiche (N-nitroso-nor-nicotina, N-nitroso-dimetilamine, N-nitrosopirrolidina, ecc.), le amine aromatiche (2-toluidina, 2-6-dimetilalanina, 2-naftalina, etc.), le aldeidi (formaldeide, acetaldeide, etc.), i composti fenolici (catecolo), gli idrocarburi volatili (benzene, nitrobenzene), i composti organici (ossido di etilene, ossi di propilene), i metalli (arsenico, nichel) ed i radioisotopi. L'irritazione termica diretta sulle mucose orali prodotta dalla combustione è un probabile cofattore, come dimostrato dal fatto che il rischio di sviluppare un carcinoma orale è ancora più elevato nei soggetti che praticano il reverse smoking, ovvero il fumo di sigaretta con l'estremità accesa posta all'interno del cavo orale, diffusa in alcune zone dell'India e del Sud America.

L'azione cancerogena del tabacco non fumato (tabacco masticato o inalato [snuff]) risulta essere inferiore rispetto a quella del fumato e sembrerebbe esercitarsi nell'area di mucosa orale esposta a diretto contatto con il tabacco stesso che viene tendenzialmente mantenuto nel fornice labiale. Inoltre, in alcune regioni indiane e del Sud-Est asiatico è diffusa l'usanza di masticare il Quid o Pann, ottenuto avvolgendo in una foglia di betel, una mistura composta da tabacco, noci di areca, calce sciolta, lime e altre spezie, capace di indurre una degenerazione della mucosa orale nota come fibrosi orale sottomucosa, riconosciuta come un disordine potenzialmente maligno ad elevato tasso di trasformazione neoplastica. Infine, masticare foglie di betel anche in assenza di aggiunta di tabacco sembrerebbe aumentare il rischio di carcinogenesi orale [22, 23].

Nei soggetti che smettono di fumare, il rischio di sviluppare il cancro orale diminuisce nel tempo; infatti, circa dieci anni dalla cessazione del fumo l'incidenza del cancro orale si avvicina a quella di individui che non hanno mai fumato.

1.2.2. Alcol

Il ruolo svolto dal consumo di alcol nella cancerogenesi orale risulta sinergico a quello del tabacco, esercitando un effetto moltiplicativo e non additivo sul rischio di sviluppo di carcinoma orale. Analogamente al fumo, il rischio relativo attribuito al consumo di alcol è dose-dipendente e tempo-dipendente; pertanto, aumenta all'aumentare dell'entità e della durata di esposizione. In soggetti forti fumatori (più di 20 sigarette al giorno) e forti bevitori (più di 5 dosi di bevande alcoliche al giorno) il rischio di cancro è 13 volte superiore rispetto a soggetti esclusivamente forti fumatori o forti bevitori [24]. Tale probabilità risulta 50 / 100 volte aumentata se paragonata al rischio di soggetti non fumatori e non bevitori [20, 24]. È difficile valutare il ruolo esclusivo del consumo di bevande alcoliche nella cancerogenesi orale dato che gli studi epidemiologici relativi all'OSCC riguardano frequentemente individui fumatori; tuttavia, nei soggetti forti bevitori e non fumatori, il rischio relativo di sviluppare la neoplasia è da 2 a 6 volte superiore rispetto ai non bevitori o modesti bevitori. L'azione cancerogena delle bevande alcoliche sul cavo orale sembrerebbe essere maggiormente correlata a meccanismi indiretti piuttosto che ad un meccanismo mutageno diretto. Infatti, allontanando il biofilm salivare, riducendo la coesione cellulare e aumentando la permeabilità della mucosa orale, l'alcol potrebbe fungere da solvente per altri carcinogeni [25, 26]. Tale meccanismo giustificerebbe l'effetto oncogeno sinergico svolto da alcol e tabacco, mentre l'azione cancerogena indipendente delle bevande alcoliche potrebbe essere correlata al potere cancerogeno dell'acetaldeide, metabolita primario dell'etanolo, potenziato dagli additivi e dai contaminanti in esso contenuto [25].

1.2.3. Agenti infettivi

Tra i fattori esogeni responsabili della degenerazione neoplastica della mucosa orale, agenti micotici e virali sembrano svolgere un ruolo non trascurabile ma ancora non del tutto chiarito. L'infezione da *Candida* spp. ed il rischio di degenerazione neoplastica di alcuni disordini della mucosa orale, come la leucoplachia candidosica e/o candidosi cronica iperplastica, sembrerebbe correlato alla capacità della *Candida* di produrre sostanze potenzialmente cancerogene come la N-nitroso benzilmetilammina a partire da nitriti presenti nella saliva. Tuttavia, l'infezione da *Candida* non sembrerebbe svolgere un ruolo primario nella patogenesi di tali lesioni, piuttosto rappresentare un colonizzatore secondario di una lesione già esistente. Inoltre, non è ancora definito con chiarezza se le lesioni primarie rappresentino un substrato favorevole alla proliferazione micotica, o se la *Candida* partecipi attivamente alla trasformazione neoplastica di queste.

Inoltre, considerando anche la forte associazione fra tali forme di candidosi orale ed altri fattori eziologici, primo fra tutti il fumo di sigaretta, risulta difficile stabilire un indice di trasformazione maligno che, relativamente alle lesioni leucoplastiche sovra-infettate da *Candida* spp., risulta compreso tra il 5% ed il 10% [27].

L'infezione virale da Human Papilloma Virus (HPV) svolge un ruolo chiave nella patologia neoplastica genitale e le somiglianze istologiche tra mucosa orale e genitale hanno permesso di ipotizzare il coinvolgimento dell'infezione di genotipi ad alto rischio nella patogenesi del carcinoma orale, attraverso la produzione di oncogeni virali capaci di indurre una proliferazione cellulare incontrollata [28-30]. La prevalenza dell'HPV-DNA nelle lesioni neoplastiche orali risulta estremamente variabile, in virtù delle variabili demografiche, delle differenti tecniche di campionamento istologico e del sito tumorale primario. Dati epidemiologici confermano il ruolo eziologico del HPV nella eziopatogenesi del carcinoma tonsillare ed orofaringeo suggerendo un modello carcinogenetico specifico per la sede orofaringea, seppur non trascurando l'effetto sinergico dei classici fattori di rischio quali il fumo e l'alcol, perché si realizzi l'espressione del fenotipo maligno. Tuttavia, tale assunto non è direttamente generalizzabile a qualsiasi altra forma di carcinoma orale dato che la presenza del DNA virale nelle lesioni orali non è necessariamente espressione di un'infezione trasformante [31].

In maniera analoga, non esistono dati univoci in letteratura per poter confermare un ruolo attivo del Epstein Barr Virus (EBV) nella eziopatogenesi delle lesioni orali, contrariamente a quanto accade per il carcinoma nasofaringeo ed il linfoma di Burkitt [32]. Infine, l'Herpes Simplex Virus (HSV) sembrerebbe rappresentare un cofattore di rischio per il carcinoma orale, sinergicamente al consumo di alcol e di tabacco.

1.2.4. Radiazioni ultraviolette

La prolungata esposizione a radiazioni solari è un noto fattore di rischio per l'insorgenza di carcinomi squamosi del labbro inferiore. Anche la radioterapia diretta alla regione della testa e del collo aumenta il rischio di un nuovo tumore primitivo localizzato nel cavo orale, poiché l'irradiazione diminuisce la reattività delle cellule immunitarie e produce anomalie cromosomiche. Tale effetto risulta essere dose-dipendente; tuttavia, anche la radioterapia a basse dosi sembrerebbe aumentare il rischio locale [23].

1.2.5. Alimentazione

Diverse indagini epidemiologiche associano una riduzione del rischio di insorgenza del carcinoma orale all'aumentato consumo di frutta e verdura, probabilmente in relazione all'elevato contenuto di micronutrienti ad azione antiossidante (vitamina C, vitamina E, carotenoidi) per i quali è nota un'associazione inversa col rischio di carcinoma orale. Al contrario, un eccessivo consumo di carne rossa e di grassi potrebbe costituire un fattore di rischio [33].

Deficit specifici come deficit di vitamina B12, scarsa assunzione di ferro o anemie da carenza di ferro, e sindromi da malassorbimento intestinale, inducono atrofia dell'epitelio orale che risulta maggiormente esposto all'azione di agenti irritanti con conseguente aumento del rischio di carcinomi delle vie aerodigestive superiori [34, 35].

1.2.6. Igiene orale

Alcuni studi hanno dimostrato una correlazione tra indici di scarsa igiene orale e rischio di sviluppo di neoplasie orali, riconoscendo come uno stato di irritazione cronica delle mucose orali possa favorire l'azione oncogena di altri carcinogeni. Stati di scarsa igiene orale sono generalmente associati ad altri fattori di rischio di carcinoma orale, come abitudini tabagiche e consumo di alcol; pertanto, risulta difficile valutare il ruolo indipendente svolto da condizioni di igiene orale precaria [7].

1.2.7. Traumatismi cronici

Analogamente alla scarsa igiene orale, i traumatismi orali cronici, come la morsicatum buccarum, la presenza di manufatti protesici e restauri dentali incongrui e margini dentali taglienti, in presenza di altri carcinogeni, possono rappresentare dei fattori di modificazione (facilitatori) dei meccanismi di cancerogenesi orale, poiché inducono stati di irritazione cronica della mucosa orale [23].

1.2.8. Immunodepressione

Condizioni di deficit immunitari possono predisporre all'insorgenza di carcinoma orale, specialmente in soggetti esposti a riconosciuti fattori di rischio. È stato documentato un aumento dell'insorgenza pari ad 11 volte di neoplasie del cavo orale dopo trapianto allogenico di midollo osseo [36], rene [37] e fegato [38].

Infine, soggetti affetti da sindrome di immunodeficienza acquisita vengono considerati ad aumentato rischio di insorgenza di carcinoma orale, sebbene non vi siano evidenze definitive [23].

1.2.9. Fattori genetici

Individui con anamnesi familiare positiva per carcinoma squamocellulare orale presentano un rischio 2–4 volte aumentato di sviluppare la neoplasia ed il rischio di insorgenza di carcinomi multipli risulta addirittura 8 volte superiore. Questi dati potrebbero essere spiegati come l'influenza esercitata dai fattori genetici sull'abitudine al fumo e sul consumo di alcol, e non come una diretta predisposizione della mucosa orale alla degenerazione neoplastica. Infatti, soggetti con anamnesi familiare positiva per carcinoma squamocellulare ma non esposti a fumo di tabacco ed alcol non presentano un rischio aumentato; mentre, soggetti forti fumatori o bevitori mostrano un rischio estremamente più elevato di sviluppare una neoplasia del cavo orale rispetto a persone esposte agli stessi fattori di rischio ma con un'anamnesi familiare negativa [39]. Infine, circa il 10-20% degli individui con diagnosi di carcinoma squamocellulare orale o delle vie aeree digestive superiori hanno un maggior rischio di sviluppare neoplasie metacrone o sincrone in altre sedi del cavo orale.

1.2.10. Disordini potenzialmente maligni

Il termine “disordini potenzialmente maligni” è stato suggerito dal World Health Organization (WHO) nel Workshop del 2005 in cui è stata discussa la definizione e la classificazione delle lesioni orali con una predisposizione ad una trasformazione in senso maligno, e adottato a partire dalla 4[°] Edizione del WHO (2017), “Classificazione dei tumori della testa e del collo”. I disordini orali potenzialmente maligni (OPMD) sono manifestazioni cliniche che presentano un rischio di evoluzione in carcinoma, sia da lesioni clinicamente definibili sia da mucosa orale clinicamente normale [3]. Secondo la classificazione del WHO, gli OPMD comprendono la leucoplachia, l'eritroplachia e l'eritroleucoplachia, la fibrosi orale sottomucosa, la discheratosi congenita, la cheratosi da tabacco da masticare, la cheratosi attinica del labbro e le lesioni palatati associate a fumo invertito, la candidosi cronica, il lupus eritematoso discoide e la glossite sifilitica. La loro prevalenza risulta variabile dall'1% al 5% in base al tipo di lesione e all'area geografica considerata [40]. La prevalenza mondiale di leucoplachia raggiunge il 2-3%, oscillando fra l'1% e il 4% in Occidente e raggiungendo tassi decisamente più elevati nel Sud-Est Asiatico [41]; mentre la prevalenza mondiale dell'eritroplachia risulta decisamente inferiore (0,02-0,83%).

I principali fattori di rischio sono i medesimi del carcinoma orale, ovvero consumo di alcol e tabacco, masticazione di noce di Areca, squilibri carenziali e/o metabolici e traumatismi cronici [42]. “Leucoplachia” è il termine clinico utilizzato per descrivere chiazze bianche, non asportabili e sine causa a rischio di trasformazione neoplastica, una volta escluse altre condizioni specifiche o altre OPMD, che richiedono normalmente una biopsia [3]. La leucoplachia è il OPMD più frequente e precede circa il 46% dei carcinomi orali. Predilige soggetti di genere maschile, di oltre 50 anni di età, l'80% dei quali è un fumatore [43]. Le sedi maggiormente colpite sono la mucosa geniena e la mucosa alveolare inferiore, con diminuzione delle lesioni linguali [42]. Il rischio trasformazione maligna varia dallo 0% al 39%, con tasso annuale di rischio pari all'1%, in base alla presentazione clinica (forma omogenea vs forma non omogenea), alla sede (lingua e pavimento orale vs vermiglio) e al grado di displasia epiteliale [44]. Attualmente, il rischio medio di trasformazione neoplastica si attesta attorno al 4-5% poiché le forme omogenee, che presentano un rischio inferiore, sono molto più frequenti delle forme non omogenee [3, 45]. Lesioni eritroplastiche, ovvero aree leucoplastiche frammiste ad aree ulcero-erosive e/o eritematose, lesioni a carico del pavimento orale e della lingua e forme non omogenee presentano un rischio neoplastico maggiore e spesso al momento della diagnosi sono già presenti segni istologici di displasia epiteliale di grado variabile [44]. La displasia epiteliale orale rappresenta uno spettro di cambiamenti epiteliali citoarchitetturali causati dall'accumulo di mutazioni geniche, associate ad un aumentato rischio di progressione in

carcinoma squamocellulare orale. Il rischio medio di trasformazione maligna della displasia orale è pari al 12%, raggiungendo una percentuale pari al 39% nelle lesioni displastiche severe [46]. Tuttavia, la trasformazione neoplastica degli OPMD può verificarsi anche in assenza di displasia epiteliale. L'eritroplachia rappresenta una macchia rossastra non riconducibile ad altra patologia nota ed il suo rischio di trasformazione maligna è decisamente più elevato poiché circa la metà delle lesioni è caratterizzata dalla presenza di carcinoma in situ [47]. La leucoplachia verrucosa proliferativa (LVP) rappresenta una forma clinica distinta ed aggressiva di OPMD. Colpisce tipicamente donne anziane e le lesioni si manifestano preferibilmente in mucosa alveolare e nel palato duro. La LVP è caratterizzata da un' elevata tendenza alla multifocalità e da un alto rischio di recidiva; inoltre, la probabilità di sviluppare un carcinoma verrucoso è pari al 70% con un tasso di mortalità del 30-40% [3, 48].

1.3. CARATTERISTICHE CLINICHE DEL CARCINOMA ORALE

Il carcinoma squamocellulare orale rappresenta oltre il 90% delle neoplasie maligne del cavo orale e insieme alla displasia epiteliale orale e alla LVP costituisce il gruppo delle “lesioni e neoplasie epiteliali” secondo la 4^o Edizione della Classificazione dei tumori della testa e del collo del WHO. La restante parte di lesioni è rappresentata da neoplasie che derivano dall'epitelio delle ghiandole salivari accessorie o da tessuti di origine mesenchimale e da melanomi orali mucosi.

Nel 2% dei casi il carcinoma orale a può presentare foci multipli, che possono manifestarsi contemporaneamente (carcinomi sincroni) o dopo un intervallo di tempo variabile (metacroni).

Il carcinoma orale è caratterizzato da un elevato rischio di recidive locali, una precoce tendenza infiltrativa e da una diffusione linfatica più frequente rispetto a quella ematogena, che si manifesta raramente ed in fase tardiva di malattia, coinvolgendo principalmente il polmone, le ossa, il fegato ed il cervello [49, 50].

1.3.1. Iter diagnostico

La corretta diagnosi di carcinoma squamocellulare orale prevede la conduzione di un'accurata anamnesi e di un esame clinico intra ed extra orale per la formulazione di una diagnosi clinica di OSCC, un esame biotico per l'accertamento diagnostico istopatologico ed esami strumentali per la determinazione dell'estensione locale e dell'eventuale diffusione regionale ed a distanza.

L'anamnesi prevede un'attenta indagine relativa allo stile di vita del paziente, in particolare, l'assunzione di tabacco, l'abuso di alcol, le abitudini di scarsa igiene orale, ed una storia familiare o personale di neoplasie della regione della testa e del collo. Inoltre, è necessaria la valutazione dei possibili segni e sintomi riportati dal paziente, che possono risultare estremamente sfumati, a partire dalla sensazione di presenza della lesione per variazione di consistenza della mucosa, fino alla sensazione di dolore, sanguinamento gengivale, ipoestesia e parestesia, e nei casi più avanzati, serramento e dolore nell'apertura della bocca, asimmetrie facciali e difficoltà nella deglutizione e nella fonazione [51, 52]. L'esame clinico rappresenta il momento fondamentale nella formulazione del sospetto diagnostico poiché consente la valutazione delle caratteristiche macroscopiche e del sito della lesione. Tale valutazione si basa sull'ispezione e sulla palpazione intra ed extra orale al fine di determinare il colore, l'aspetto superficiale, la consistenza, lo stato dei bordi e l'infiltrazione in profondità della lesione.

Tali dati, insieme all'anamnesi, ed a segni e sintomi riferiti dal paziente, orientano il medico verso un'ipotesi diagnostica e verso la pianificazione di esami, strumentali e non, di livello successivo.

I seguenti segni e sintomi debbono essere considerati come un campanello di allarme e far sospettare la trasformazione di una lesione preesistente [53, 54]:

- 1) una macchia colorata o una chiazza bianca squamosa persistente che aumenta improvvisamente di dimensione;
- 2) un'ulcera che non regredisce nonostante l'allontanamento di ogni possibile agente traumatizzante;
- 3) un sanguinamento gengivale più o meno diffuso;
- 4) un'improvvisa mobilità dentale specie in assenza di storia di malattia parodontale;
- 5) la mancata guarigione di un alveolo post estrattivo;
- 6) la perdita di ritenzione di un manufatto protesico;
- 7) le alterazioni della sensibilità quali ipoestesi o parestesi orali;
- 8) un serramento o un dolore nell'apertura della bocca;
- 9) una progressiva asimmetria facciale;
- 10) la difficoltà di deglutizione e di linguaggio.

La presentazione clinica è variabile con cambiamenti di aspetto della mucosa che può presentare macchie e/o placche bianche, eritematose, nodulari, ulcerate e/o miste.

L'aspetto macroscopico del carcinoma orale è classificabile in tre forme cliniche distinte di neoplasia: a) esofitica; b) endofitica; e c) ulcerata.

La forma esofitica appare come una escrescenza rilevata sulla mucosa sana, plurimammellonata, a cavolfiore, di colorito bianco o bianco-rosa, a cui corrispondono generalmente forme istologiche

ben differenziate. La forma endofitica può presentarsi con una variante nodulare ed una infiltrante. Quella nodulare appare come un nodulo di consistenza aumentata al tatto, originato al di sotto di una mucosa apparentemente sana. La forma infiltrante si manifesta come indurimento della parte interessata associata a deficit funzionali quali l'impossibilità di protrusione o laterodeviazione della lingua o il serramento per il coinvolgimento della muscolatura masticatoria. Infine, la forma ulcerata, la più comune, si manifesta come una ulcerazione irregolare a bordi induriti talora rilevati e sottominati, di consistenza dura al tatto. Il fondo è generalmente sanguinante, vegetante, o ricoperto da materiale emorragico, fibrotico o necrotico. La combinazione di lesioni vegetanti ed ulcerative determina lesioni di aspetto misto, o meglio ulcero-vegetanti. Una variante è rappresentata dalla forma erosiva superficiale che appare come un'area rossa della superficie mucosa, talora ad aspetto vellutato, talora disomogeneo, con aree bianche per la quale la diagnosi differenziale con l'eritroplachia è unicamente istologica [55, 56] (Figura 9).



Figura 9. Immagini rappresentative di forme cliniche di carcinoma squamocellulare orale.

Per l'accertamento del sospetto clinico deve essere formulata una diagnosi istopatologica. Attualmente, il Gold Standard è rappresentato dall'esame biotico che consiste nel prelievo di tessuto patologico al fine di valutare le caratteristiche microscopiche della lesione.

Per lesioni sospette di grandi dimensioni, maggiori di un centimetro, è indicata l'esecuzione di una biopsia incisionale, ovvero il prelievo di uno o più frammenti di lesione, che rimane quindi sostanzialmente imm modificata e chiaramente identificabile in attesa della futura terapia. Per lesioni di aspetto omogeneo è solitamente sufficiente un singolo prelievo (biopsia incisionale semplice), dato che anche a livello istologico è presumibile riscontrare una sostanziale omogeneità. Al contrario, per le lesioni con aspetto disomogeneo è indicato effettuare più prelievi (mappatura)

biopsiando le aree clinicamente più sospette secondo un ben preciso ordine di gravità: ulcere e/o erosioni, placche e macchie rosse, aspetti verrucosi bianchi e rossi, placche e macchie bianche.

La biopsia escissionale prevede l'asportazione dell'intera lesione; pertanto, risulta indicata per lesioni sospette di limitata estensione, con diametro inferiore ad un centimetro, ad invasione superficiale. I campioni biotici vanno riposti in formalina al 10%, conservati a temperatura ambiente e consegnati in laboratorio entro 24 ore, allegando una dettagliata scheda relativa ai dati anamnestici del paziente, alle caratteristiche macroscopiche della lesione ed ai risultati di altre indagini diagnostiche pertinenti.

La diffusione linfatica viene valutata attraverso l'esame clinico palpatorio e tecniche di imaging (ecografia, tomografia computerizzata, risonanza magnetica). La palpazione dei linfonodi del collo ha una sensibilità estremamente variabile (dal 16% al 66%), in funzione dell'esperienza dell'operatore, della profondità delle formazioni da esaminare e dall'anatomia del collo.

Alla palpazione, linfonodi cervicali metastatizzati risultano generalmente induriti, ingrossanti e, in caso di diffusione extracapsulare, fissi sui piani sottostanti. La diffusione linfatica è frequente e precoce specie per neoplasie della lingua, organo caratterizzato da una complessa rete neurale ed un complesso drenaggio linfatico. La disseminazione linfonodale rappresenta il fattore di rischio avverso più rilevante, capace di ridurre drammaticamente la sopravvivenza globale a breve termine al di sotto del 50% [54]. L'infiltrazione linfonodale è influenzata da molteplici fattori quali la sede primaria della neoplasia, la profondità di invasione, l'istotipo tumorale, la differenziazione istologica, la struttura anatomica dell'organo interessato e la relativa rete linfatica, e i rapporti anatomici con le strutture adiacenti. Essa avviene mediante il passaggio di emboli del tumore primitivo attraverso i vasi linfatici internodali o la diffusione extracapsulare diretta. I livelli linfonodali generalmente coinvolti sono rappresentati dai linfonodi sottomandibolari e sottomentali. Le metastasi linfonodali si presentano generalmente ipsilateralmente; tuttavia, neoplasie localizzate in zone anteriori e/o mediane del cavo orale tendono a diffondersi bilateralmente. Inoltre, alcuni tumori, specie quelli che coinvolgono il dorso linguale e/o il pavimento orale, possono diffondersi "a salto" ovvero metastatizzare senza seguire necessariamente l'ordine sequenziale dei livelli linfonodali (*skip metastasis*).

La presenza di metastasi a distanza viene accertata mediante di tecniche di imaging (ecografia epatica, radiografia del torace, tomografia computerizzata, risonanza magnetica, scintigrafia ossea). Il loro riscontro nel carcinoma orale è considerato un evento raro e la sede maggiormente interessata è il polmone, seguita da fegato, ossa e cervello [57].

1.4. ISTOPATOLOGIA DEL CARCINOMA ORALE

Il carcinoma squamocellulare orale è una neoplasia epiteliale che origina dall'epitelio mucoso, caratterizzata da vari gradi di differenziazione squamosa e capacità invasiva. La differenziazione squamosa si contraddistingue per la presenza di cheratinizzazione con o senza formazione di perle di cheratina e/o ponti intercellulari. L'invasione si manifesta come interruzione della membrana basale dall'epitelio superficiale e con la crescita in profondità, nel connettivo sub-epiteliale, delle cellule neoplastiche organizzate in isole, cordoni o nidi isolati. L'invasione spesso si accompagna a reazione desmoplastica stromale che consiste nella proliferazione di miofibroblasti, eccessiva deposizione di matrice e neoangiogenesi. Le cellule tumorali possono infiltrare il tessuto adiposo, muscolare ed osseo, invadere i vasi linfatici e sanguigni e/o diffondere nel piano perineurale. L'invasione epiteliale può indurre una reazione immuno-infiammatoria e può essere presente necrosi tumorale [3].

In base al grado di differenziazione, al pleomorfismo cellulare ed all'attività mitotica, il grading istologico della 4[°] Edizione della Classificazione dei tumori della testa e del collo del WHO, riconosce tre forme di carcinoma squamocellulare.

I carcinomi ben differenziati ricordano l'epitelio squamoso sano e contengono grandi cellule differenziate con citoplasma eosinofilo, ponti intercellulari prominenti, nuclei rotondi, non necessariamente ipercromatici, organizzate in nidi, isole, e cordoni, e numerose cellule discheratosiche e perle squamose. Le neoplasie moderatamente differenziate esibiscono maggior pleomorfismo cellulare e nucleare, maggior numero di mitosi, incluse quelle atipiche, ed un minor grado di cheratinizzazione. Infine, i tumori scarsamente differenziati presentano cellule basali prominenti, con frequenti mitosi atipiche, ponti intercellulari appena distinguibili e cheratinizzazione minima o assente. Generalmente, il fronte infiltrativo di tali neoplasie è caratterizzato da margini scarsamente definiti, composti da proiezioni frastagliate, piccole isole di cellule irregolari o singole cellule neoplastiche disperse. Anche se la cheratinizzazione è tipicamente presente nelle entità maggiormente differenziate, non è considerata un criterio morfologico fondamentale nel grading dei carcinomi squamocellulari [3, 58].

Sono state identificate otto varianti istologiche di OSCC: 1) il carcinoma squamocellulare (SCC) verrucoso, variante ben differenziata caratterizzata dalla mancanza di citologia maligna, invasività locale e assenza di potenziale metastatico; 2) il SCC basaloide, entità aggressiva a rapida crescita caratterizzata da una componente basaloide predominante ed evidenza di differenziazione squamosa; 3) il SCC papillare, una variante rara con prognosi favorevole che insorge tipicamente nel tessuto gengivale (forma extraossea); 4) il SCC a cellule fusate, entità francamente maligna

costituita da un SCC ed una componente maligna a cellule fusate e /o pleomorfe; 5) il SCC acantolitico, una variante rara caratterizzata da acantolisi delle cellule tumorali; 6) il SCC adenosquamoso, altamente invasivo che mostra differenziazione squamosa e ghiandolare; 7) il carcinoma linfoepiteliale, scarsamente differenziato o indifferenziato, caratterizzato da un importante infiltrato linfoplasmocitico reattivo; 8) il carcinoma cuniculatum, raro e ben differenziato, composto da numerose cripte cheratinizzate [3].

1.5. STADIAZIONE DEL CARCINOMA ORALE

In accordo con le linee guida della 8^o Edizione del Cancer Staging Manual, American Joint Committee on Cancer (AJCC), i fattori prognostici richiesti per la stadiazione patologica del carcinoma squamocellulare orale sono rappresentati dalle categorie pT, pN, pM.

La stadiazione permette di valutare l'estensione anatomica della malattia e si basa su tre parametri fondamentali: l'estensione massima del tumore primitivo (T); l'interessamento dei linfonodi regionali (N); e la presenza di metastasi a distanza (M). La classificazione clinica (cTNM) viene formulata grazie ai dati clinici raccolti prima del trattamento chirurgico attraverso l'esame obiettivo e le tecniche di imaging. La classificazione patologica (pTNM) può essere determinata unicamente dopo l'esecuzione di una terapia chirurgica ad intento curativo, valutando i parametri stadianti mediante microscopia ottica, su sezioni istologiche seriali.

La nuova classificazione pTNM dell'AJCC ha introdotto due nuovi parametri stadianti: 1) Depth of Invasion (DOI); 2) Extranodal Extension (ENE). Il DOI, o spessore di infiltrazione, rappresenta l'infiltrazione neoplastica misurata indipendentemente dalla componente macroscopica del tumore. Non corrisponde allo spessore tumorale, ma viene determinato a partire dalla membrana basale della mucosa sana adiacente al tumore, proseguendo per una linea perpendicolare che giunge fino al punto di massima infiltrazione neoplastica. Il DOI deve essere calcolato su campione chirurgico ed in caso di dubbio deve essere attribuito lo spessore minimo per evitare cambiamenti di stadio. Tale parametro rappresenta un fattore prognostico indipendente correlato ad uno stadio di malattia avanzato ed allo sviluppo di metastasi linfonodali.

Le linee guida AJCC hanno identificato tre categorie di rischio: neoplasie poco invasive (DOI ≤ 5 mm), moderatamente invasive (5 mm < DOI ≤ 10 mm) e altamente invasive (DOI > 10 mm).

L'ENE rappresenta l'estensione del tumore metastatico, attraverso la capsula linfonodale e nel connettivo circostante, indipendentemente dalla reazione stromale associata. Istologicamente l'ENE viene distinto in: ENE n (assente); ENE mi (microscopico; ≤ 2 mm); ed ENE ma (macroscopico; estensione extranodale macroscopicamente visibile o estensione microscopica > 2 mm). La diagnosi

di ENE patologico è necessariamente istologica e solamente l'ENE macroscopico risulta stadiante, poiché attualmente le modalità di imaging non sono in grado di definire accuratamente l'ENE. Tale parametro non è stato integrato nella stadiazione pTNM del carcinoma squamocellulare orale HPV-correlato. Infine, la nuova classificazione AJCC raccomanda la valutazione del Worst Pattern of Invasion-5 (WPOI-5) definito come la presenza di satelliti tumorali ad una distanza \geq di 1 mm dal fronte infiltrativo del tumore. Vengono considerati satelliti tumorali sia la presenza di piccoli nidi e cellule singole sia l'invasione perineurale e linfovaskolare extra-tumorale con nervo intrappolato. Il WPOI-5 rappresenta un fattore prognostico indipendente predittivo di recidiva locoregionale ma attualmente non risulta integrato nella nuova stadiazione pTNM [59].

La stadiazione patologica del carcinoma squamocellulare HPV negativo, secondo la 8° Edizione del Cancer Staging Manual del 2018 (AJCC) è rappresentata in Tabella 1.

Stadio patologico	T	N	M
0	Is	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
	1-2-3	1	0
IV a	4 a	0-1	0
	1-2-3-4 a	2	0
IV b	4 b	Ogni N	0
	Ogni T	3	0
IV c	Ogni T	Ogni N	1

Tabella 1. Stadiazione patologica del carcinoma squamocellulare orale HPV-negativo. 8° Edizione del Cancer Staging Manual, American Joint Committee on Cancer (Is: In situ).

1.5.1. Classificazione istopatologica del tumore primario p(T)

Il pT esprime la dimensione massima del tumore riferita ad uno dei diametri considerabili (lunghezza, larghezza, spessore) in centimetri e lo spessore di infiltrazione (DOI) in millimetri. Il pT è ottenuto mediante misurazione del campione chirurgico prima della sua fissazione in formalina che può provocare una contrazione tissutale fino al 30% del campione [60].

Il parametro pT viene così classificato:

- TX: tumore primario non valutabile;
- Tis: carcinoma in situ;
- T1: tumore \leq di 2 cm di dimensioni massime e DOI \leq di 5 mm;
- T2: tumore \leq di 2 cm di dimensioni massime e DOI compreso fra 5 – 10 mm; oppure tumore di diametro massimo compreso fra 2 e 4 cm e DOI \leq di 10 mm;
- T3: tumore $>$ di 4 cm di dimensioni massime oppure qualsiasi tumore con DOI $>$ 10 mm;
- T4a delle labbra (malattia locale moderatamente avanzata): tumore che ha invaso l'osso corticale mascellare, il nervo alveolare inferiore, il pavimento orale o la cute della faccia (mento o naso);
- T4a del cavo orale (malattia locale moderatamente avanzata): tumore che ha invaso solo le strutture anatomiche adiacenti (osso corticale mascellare, cute della faccia e seno mascellare);
- T4b (malattia locale altamente avanzata): tumore che ha invaso i pilastri pterigoidei, lo spazio masticatorio, la base cranica e/o ingloba l'arteria carotide interna.

L'erosione superficiale dell'osso alveolare da parte di un tumore primitivo di origine gengivale (extraossea) non è sufficiente per determinare uno stadio pT4. Con l'introduzione del DOI, l'infiltrazione della muscolatura estrinseca della lingua non è più criterio di inclusione nello stadio pT4, poiché di difficile valutazione clinica e istopatologica.

1.5.2. Classificazione istopatologica delle metastasi linfonodali (pN)

Nella classificazione istopatologica delle metastasi linfonodali laterocervicali, i linfonodi della linea mediana sono considerati nodi ipsilaterali. Per valutare il pN, il campionamento della dissezione selettiva del collo deve includere almeno 10 linfonodi, mentre la dissezione linfonodale radicale (livelli I-IV) e la radicale modificata (livelli I-V) devono comprenderne almeno 15.

Il parametro pN viene così classificato:

- NX: linfonodi regionali non valutabili;
- N0: assenza di metastasi linfonodali regionali;
- N1: metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale, con dimensione massima \leq di 3 cm ed ENE (-);
- N2a: metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale o controlaterale con dimensione massima \leq di 3 cm e ENE (+); oppure metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale con dimensione massima compresa fra 3 e 6 cm ed ENE (-);
- N2b: metastasi in multipli linfonodi ipsilaterali, tutti con dimensione massima \leq di 6 cm ed ENE (-);
- N2c: metastasi in linfonodi bilaterali e/o controlaterali, tutti con dimensione massima \leq di 6 cm ed ENE (-);
- N3a: metastasi in un linfonodo con dimensione massima $>$ di 6 cm ed ENE (-);
- N3b: metastasi in un singolo linfonodo ipsilaterale con dimensioni massime $>$ di 3 cm ed ENE (+); oppure multiple metastasi ipsilaterali, controlaterali e/o bilaterali con ENE (+).

1.5.3. Classificazione delle metastasi a distanza (M)

In assenza di sintomi, le procedure diagnostiche minime da effettuare sono una radiografia del torace ed una ecografia epatica. La classificazione prevede la presenza (M1) o l'assenza (M0) di metastasi a distanza.

1.6. FATTORI PROGNOSTICI RACCOMANDATI PER LA GESTIONE DEL CARCINOMA ORALE

Ulteriormente a DOI ed ENE, i fattori prognostici raccomandati per le cure cliniche sono rappresentati dal pattern di invasione (POI), lo stato dei margini, l'invasione perineurale (PNI) e linfovaskolare (LVI), lo stato di salute generale e lo stile di vita. Sebbene il grading istologico non venga più considerato né fattore prognostico stadiativo né aggiuntivo, si ritiene opportuna la sua trattazione, unitamente ai fattori sopra menzionati.

1.6.1. Grading Istologico

Il grading istologico rappresenta il grado di differenziazione tumorale valutato sulla base delle caratteristiche citoarchitetture tumorali. Tale concetto fu introdotto da Broders A.C. nel 1920, il quale classificò il grado istologico di malignità in base alla percentuale di epitelio squamoso differenziato dell'intero campione tumorale. Rilevanti furono le ricerche di Crissman J.D. (1980), che introdusse il grading del "pattern di invasione", inteso come capacità di coesione ed associazione cellulare tumorale a livello del fronte infiltrativo. In base a quest'ultimo, le neoplasie coesive ben differenziate presentano margini infiltrativi ben delineati e compressivi, mentre i tumori non coesivi poco differenziati infiltrano mediante piccoli ed irregolari aggregati cellulari o in cellule singole. Nel 1989, Bryne M., modificando il grading di Anneroth G., propose l'"*Invasive Cell Grading*", dimostrando come la valutazione delle caratteristiche istomorfologiche nell'area più anaplastica dei siti maggiormente invasivi dei campioni chirurgici fosse più affidabile rispetto ai prelievi biotici. Inoltre, come già proposto da Anneroth G., l'Autore ha sottolineato l'importanza della caratterizzazione della relazione fra tessuto neoplastico e stroma tumorale adiacente al fronte infiltrativo, ovvero la determinazione del pattern di invasione [61].

Attualmente, il grading istologico convenzionalmente adottato dalla 8° Edizione AJCC, fa riferimento alla 4° Edizione del WHO Grading System (vedi Capitolo 1.4), basato sui seguenti parametri citoarchitetture: grado di differenziazione, pleomorfismo cellulare ed attività mitotica.

Il significato prognostico di tale parametro è questione altamente dibattuta, data la mancanza di criteri valutativi oggettivi. Dato lo scarso valore predittivo, il grading istologico non sarebbe correlato né alla presenza di metastasi linfonodali né alla sopravvivenza globale, né andrebbe considerato per la pianificazione del trattamento [62, 63].

1.6.2. Pattern di Invasione

Sono stati proposti differenti sistemi di classificazione del "pattern di invasione" in base alle caratteristiche istomorfologiche del fronte infiltrativo. Il grande svantaggio di tali sistemi risiede nella significativa variabilità inter ed intra-osservatore ed attualmente la letteratura non fornisce un sistema di punteggio standardizzato. La maggior parte degli studi scientifici fa riferimento alla classificazione di Brandwein-Gensler et al. che, suddividendo il grading istologico del fronte infiltrativo in cinque categorie, definisce più specificatamente il pattern di invasione non coesivo. Il fronte infiltrativo tumorale viene come di seguito classificato: POI 1: bordi infiltrativi compressivi e ben delineati; POI 2: infiltrazione in cordoni solidi, bande e/o nidi tumorali; POI 3: piccoli gruppi o

cordoni di cellule infiltranti (> 15 cellule); POI 4: dissociazione cellulare marcata e diffusa di piccoli gruppi cellulari (<15 cellule) e/o in cellule singole; POI 5: satelliti tumorali di qualsiasi dimensione ad una distanza ≥ 1 mm dal fronte infiltrativo o il satellite più vicino con interposizione di tessuto sano [64]. Nella definizione del WPOI non si fa riferimento ad un valore di cut-off minimo; la presenza anche di un piccolo gruppo tumorale (< 15 cellule) o di una singola cellula tumorale infiltrante viene considerata positiva, come descritto da Brandwein-Gensler; anche se per semplificare e migliorare la prognosi l'AJCC raccomanda di valutare solamente la presenza del WPOI-5 (vedi Capitolo 1.4). Indipendentemente dalla sede orale e dallo stadio di malattia, il WPOI rappresenta un fattore prognostico indipendente di evoluzione di malattia e di recidiva locoregionale, scarsa sopravvivenza globale e specifica da malattia [65-68], ed infiltrazione del tessuto osseo corticale e midollare [69]. In particolare, nel carcinoma squamocellulare orale della lingua (OTSCC) in stadio iniziale, il WPOI è significativamente correlato allo sviluppo di metastasi linfonodali controlaterali e bilaterali ed al rischio di decesso per malattia [70-72]. Alcuni Autori hanno valutato anche il P-POI (pattern di invasione prevalente) ed il SP-POI (somma dei due pattern di invasione prevalenti o cut-off > 20% del fronte tumorale invasivo), [73] altri ancora hanno utilizzato un sistema classificativo dicotomico (es: POI coesivo vs POI infiltrativo oppure “crumb POI” vs “trabecular POI”) [74]. Il P-POI e la combinazione dello score del P-POI e del WPOI hanno dimostrato un elevato valore prognostico, tanto che diversi Autori suggeriscono la valutazione morfologica del POI per guidare le scelte clinico-terapeutiche post-operatorie, il management chirurgico dei linfonodi laterocervicali, e per determinare il rischio di metastasi linfonodali occulte negli OSCC e OTSCC in stadio iniziale [73, 75, 76]. Tuttavia, il POI rimane un criterio prognostico minore data l'eterogeneità del fronte infiltrativo e la mancanza di criteri quantitativi che definiscano il modello di invasione.

1.6.3. Margini di resezione

In termini prognostici, risulta fondamentale distinguere il margine resettivo intraoperatorio, influenzato dal piano di trattamento e dal metodo di campionamento adottato, ed il margine chirurgico che guida le scelte terapeutiche postoperatorie. Secondo le linee guida del *Royal College of Pathologists* il margine di resezione viene classificato in “libero o negativo” se la distanza dal carcinoma invasivo risulta maggiore di 5 mm, in “stretto” in presenza di carcinoma invasivo fra 1 e 5 mm dal margine neoplastico ed in “positivo” in presenza di carcinoma invasivo entro 1 mm dal margine neoplastico o in presenza di displasia epiteliale moderata o severa (carcinoma in-situ) sul margine [77]. La presenza di cellule tumorali nel margine di resezione o in stretto contatto con esso

impone la pianificazione di un ulteriore intervento chirurgico o di una terapia adiuvante postoperatoria. Tuttavia, tumori con margini di resezione negativi non risultano esenti da recidive ed il reale valore prognostico del margine “stretto” non è del tutto chiaro. Spesso tale parametro viene scelto arbitrariamente sia in termini quantitativi, data la mancanza di un cut-off standardizzato, sia qualitativi, dato che la presenza di displasia moderata e/o severa sul margine neoplastico non viene universalmente presa in considerazione. Inoltre, il restringimento tissutale dopo la fissazione del campione in formalina, l’elasticità mucosa ed il sito e lo stadio di malattia rappresentano alcuni degli svariati fattori confondenti. Pertanto, la corretta interpretazione del margine chirurgico e il suo rapporto con la sopravvivenza rappresentano una questione altamente controversa [78].

1.6.4. Invasione Perineurale

L’invasione perineurale è definita come la presenza di cellule tumorali all'interno di uno dei tre strati della guaina nervosa (endonevrio, perinevrio, epinevrio) e/o come la presenza di cellule tumorali in stretta prossimità di un nervo che viene coinvolto almeno nel 33% della sua circonferenza [79]. Questa definizione permette di classificare la PNI in maniera dicotomica come la presenza/assenza di invasione perineurale. Pertanto, sono stati presi in considerazione ulteriori parametri valutativi quali la circonferenza e/o il calibro del nervo coinvolto, l’invasione di un nervo intratumorale o di uno extratumorale/peritumorale e il numero di focolai nervosi infiltrati [80-84]. Secondo le linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) la presenza di PNI rappresenta un fattore di rischio avverso per il quale viene richiesto un trattamento adiuvante [85]. Pertanto, le linee guida AJCC raccomandano la classificazione del PNI in intratumorale/extratumorale ed in focale (coinvolgimento di un singolo ramo nervoso in qualsiasi parte del campione) / plurifocale (coinvolgimento di ≥ 2 rami nervosi in qualsiasi parte del campione). Inoltre, in caso di coinvolgimento plurifocale extratumorale deve essere riportato il diametro del nervo di maggior dimensione. La ricerca scientifica associa la presenza di PNI e la multifocalità infiltrativa al DOI elevato, pT e uno stadio di malattia avanzato [82, 86], LVI [87] e presenza di tumor budding (TB) [88]. Inoltre, tale parametro risulta associato a recidive locali e locoregionali, specie in carcinomi in stadio iniziale [89-95]. In particolare, la presenza di PNI plurifocale e la contemporanea presenza di PNI intra e peritumorale sono significativamente correlate ad elevato rischio di metastasi linfonodali e di decesso per malattia [87, 96]. Tuttavia, emerge un’elevata variabilità riguardante il grado di intimità (mero contatto o presenza di cellule interne alla guaina nervosa) e i vari modelli di relazione (coinvolgimento completo/incompleto,

laminazione concentrica o contatto tangenziale). Attualmente, la scelta della percentuale di circonferenza nervosa coinvolta è assunta arbitrariamente, non riproducibile e priva di validità statistica. Pertanto, dovrebbero essere definiti criteri oggettivi e riproducibili per la valutazione del PNI [97-99].

1.6.5. Invasione linfovaskolare

L'invasione linfovaskolare è definita come la presenza di cellule o aggregati di cellule tumorali nella parete o nel lume di spazi (canali linfatici e/o sanguigni) rivestiti da endotelio. La presenza di LVI è inequivocabile se le cellule neoplastiche si trovano all'interno di uno spazio rivestito da endotelio o se sono focalmente aderenti alla parete del vaso [100]. Al contrario, LVI è considerato negativo quando i risultati sono equivoci o sono dei semplici artefatti, come ad esempio la retrazione del tumore o la dislocazione delle cellule tumorali in spazi vuoti. La proliferazione di nuovi vasi sanguigni (neoangiogenesi) e di vasi linfatici (linfoangiogenesi) è considerato un segno distintivo di cancro. La linfoangiogenesi sembra essere essenziale per la diffusione del tumore al di fuori del sito primario. Infatti, i capillari linfatici hanno un lume più elevato rispetto ai sanguigni e mancano di una membrana basale continua, facilitando l'invasione linfatica e la metastatizzazione nodale, specie nella regione del distretto testa collo in virtù del cospicuo drenaggio linfatico [101]. Pertanto, anche la LVI è stata inclusa tra i fattori di rischio avversi per la pianificazione del trattamento adiuvante del carcinoma orale, significativamente associata a ridotta sopravvivenza globale e libera da malattia [59]. Tuttavia, non è chiaro in che misura la neoplasia induca linfoangiogenesi e la localizzazione intratumorale o peritumorale dei nuovi vasi formati; così come la via preferenziale di diffusione (intratumorale vs peritumorale). L'evidenza scientifica suggerisce che le cellule tumorali si diffondano attraverso i vasi linfatici peritumorali, mentre la diffusione intratumorale viene considerata un percorso aggiuntivo di metastatizzazione. Infine, la LVI sembrerebbe associata ad una maggior profondità di invasione tumorale, data l'architettura tridimensionale della rete linfatica, in cui i capillari linfatici più piccoli e più superficiali, convergono in vasi sempre più ampi e profondi [102]. Come per la PNI, l'AJCC raccomanda la classificazione della LVI in intratumorale ed extratumorale e in focale e plurifocale.

2. LO STROMA CONNETTIVALE

2.1. CARATTERISTICHE DELLO STROMA CONNETTIVALE FISIOLÓGICO

Con il termine tessuto connettivo viene indicato un tipo di tessuto di origine mesodermica che fornisce sostegno strutturale e metabolico ai vari organi e tessuti dell'organismo. Esso media lo scambio di sostanze nutritive, di metaboliti e di prodotti di scarto fra i tessuti ed il sistema circolatorio. Il tessuto connettivo è costituito da una componente cellulare fissa (residente), che svolge il proprio ciclo vitale nel tessuto connettivale, ed una mobile, che raggiunge il tessuto connettivo mediante circolo linfatico ed ematico, e da una componente acellulare chiamata matrice extracellulare (ECM). La componente cellulare è rappresentata da fibroblasti, cellule mesenchimali indifferenziate, cellule mesenchimali differenziate (osteoblasti, condroblasti, odontoblasti, cementoblasti, adipociti), e cellule emopoietiche (monociti-macrofagi, cellule dendritiche, mastociti, plasmacellule, leucociti, linfociti). La matrice extracellulare è costituita dalla sostanza amorfa, un reticolo tridimensionale di proteoglicani, glicosaminoglicani (GAG) e glicoproteine strutturali, e da una componente fibrillare, fibre collagene, reticolari ed elastiche. Essa determina gran parte delle proprietà fisiche dei tessuti connettivi, contribuisce alla segnalazione cellulare paracrina, regolando il trasporto ed il deposito di molecole idrosolubili e fungendo da riserva di liquidi per il mantenimento del turgore extracellulare, e partecipa al processo di interazione fibrocellulare. Esistono numerosi istotipi connettivali con differenti proprietà fisiche e funzionali. Nella maggior parte degli organi, il tessuto connettivo lasso, il cosiddetto stroma, costituisce il supporto delle cellule e dei tessuti del parenchima. Infatti, lo stroma connettivale rappresenta una tipologia di tessuto connettivo fibroso, formato principalmente da fibroblasti e da fibre collagene, che si sviluppa dai setti laminari della capsula degli organi pieni. Esso è essenziale per il mantenimento dell'integrità dei tessuti parenchimali e contiene una complessa rete di cellule e macromolecole che collaborano per il sostentamento dell'omeostasi tissutale fisiologica. Tali funzioni sono garantite dal continuo crosstalking fra le cellule epiteliali e stromali, mediato da contatti intercellulari diretti o da altre molecole. Fisiologicamente, lo stroma è una fonte di fattori di crescita, di nutrienti, e di ossigenazione, fungendo da medium per la diffusione di fluidi, ioni, ormoni, gas (esempio CO₂, NO, O₂) e prodotti di scarto [103].

2.1.1. La componente cellulare: i fibroblasti

Le cellule del tessuto connettivo derivano da precursori embrionali comuni che nel loro insieme costituiscono il primitivo tessuto di sostegno embrionale, chiamato mesenchima. La loro funzione predominante è la sintesi ed il mantenimento della matrice.

I fibroblasti sono le cellule più abbondanti del tessuto connettivo e rappresentano un gruppo eterogeneo di cellule fusiformi di origine mesenchimale con uno spettro di fenotipi caratterizzati da vari gradi di contrattilità [104]. Sono responsabili della sintesi e della secrezione degli elementi fibrosi della matrice e delle molecole interfibrillari, specie del collagene tipo I, III e V e della fibronectina. Inoltre, contribuiscono alla formazione della membrana basale, secernendo collagene tipo IV e laminina, e provvedono alla degradazione della matrice mediante secrezione di enzimi proteolitici [105]. I fibroblasti regolano il mantenimento dell'omeostasi tissutale esprimendo enzimi della famiglia del citocromo P450 che degradano molecole estranee e potenzialmente tossiche. Inoltre, reclutano e regolano l'infiltrazione leucocitaria attraverso la secrezione di citochine, chemochine e fattori di crescita [106].

I fibroblasti esercitano molte delle loro funzioni in uno stato non proliferativo, detto “inattivo” o “quiescente”, in cui sono comunque in grado di migrare e secernere componenti di matrice e proteine di segnalazione. Il fibroblasto “inattivo” è una cellula allungata con scarso citoplasma e nucleo appiattito, contenente cromatina condensata indicativa di bassi livelli di attività trascrizionale. Ferite tissutali e/o condizioni patologiche possono indurre i fibroblasti a proliferare e a secernere elevati livelli di proteine. Il fibroblasto “attivo” ha un nucleo pallido e di forma ovale ed un citoplasma più ampio. Il grado di sintesi e di secrezione è strettamente correlato alla quantità di reticolo endoplasmatico ruvido, di granuli secretori e di mitocondri e all'estensione del complesso del Golgi presenti nel citoplasma. Il citoscheletro di actina garantisce motilità e contrattilità, essenziali per il movimento attraverso la sostanza fondamentale durante la formazione ed il rimodellamento connettivale.

Sebbene i fibroblasti dei diversi tessuti abbiano aspetti simili, esiste una notevole eterogeneità all'interno delle varie popolazioni, che si manifesta come differenza nei loro prodotti e nei loro tassi di sintesi e di turnover, nella risposta alle molecole regolatrici, e negli indici di proliferazione [106, 107].

2.1.2. *La componente fibrillare*

La componente fibrillare dei tessuti connettivi è rappresentata principalmente dal collagene, comprese le fibre reticolari, e dall'elastina. La superfamiglia del collagene comprende almeno 28 tipologie di collagene che insieme costituiscono le proteine più abbondanti dello stroma, sintetizzate nella matrice principalmente dalle cellule mesenchimali e dai suoi derivati (fibroblasti, condrociti, osteoblasti, odontoblasti e cementoblasti) sottoforma di tropocollagene, una molecola a tripla elica con diametro di circa 1,5 nm e lunghezza di 300 nm, composta da tre catene proteiche. Le molecole di tropocollagene vengono assemblate per formare microfibrille (circa 3,6 nm di diametro), che vengono organizzate in fibrille di collagene (da 10 a 500 nm di diametro) che si aggregano ulteriormente per formare le fibre (da 1 a 20 µm di diametro).

La superfamiglia del collagene è suddivisa in nove sottofamiglie in base alla loro configurazione molecolare:

1. Collagene fibrillare (collagene tipo I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) altamente organizzato a formare fibrille, spesso composte da differenti tipologie di collagene, garantisce resistenza alla trazione meccanica. Il collagene tipo I rappresenta circa il 90% del collagene presente nel nostro organismo ed è organizzato in vario modo, da più lasso a più denso, in base al supporto meccanico richiesto. Il collagene tipo III, un tempo noto come fibre reticolati, è il più abbondante nei tessuti elastici, costituisce la struttura di organi cavi e vasi sanguigni e partecipa ai processi di riparazione tissutale;
2. Collagene della lamina basale (collagene tipo IV) sintetizzato dalle cellule epiteliali non si assembla a formare fibrille, ma rappresenta la componente principale della lamina basale;
3. Collagene associato alle fibrille con tripla elica interrotta (collagene tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII) composto da catene di differente lunghezza e contenente domini non collageni che modulano le interazioni fra le fibrille;
4. Collagene transmembrana (collagene tipo XIII, XVII, XXIII, XXV) forma le proteine transmembrana coinvolte nell'adesione cellulare. Il tipo XIII è essenziale per l'adesione dei fibroblasti alla matrice nei tessuti epiteliali, nervosi e muscolari;
5. Network-collagene (collagene tipo VIII, X);
6. Collagene di ancoraggio fibrillare (collagene tipo VII);
7. Collagene formante microfibrille (collagene tipo VI);
8. Multiplexing-Collagene (collagene tipo XVIII);
9. Altri tipi di collagene (collagene tipo XXVI, XXVIII).

La degradazione del collagene può avvenire mediante: a) secrezione di enzimi appartenenti alla famiglia delle metalloproteasi di matrice (MMP), ovvero enzimi proteolitici che comprendono le collagenasi (MMP-1, 8, 13), le metalloelastasi (MMP-12), le stromelisine (MMP-3, 10, 11) e le matrilisine (MMP-7, 26); b) degradazione intracellulare per ingestione selettiva delle fibrille di collagene da parte dei fibroblasti. Quest'ultimo rappresenta il meccanismo principale del turnover fisiologico e del rimodellamento dei tessuti ricchi di collagene. Il processo prevede il riconoscimento delle fibrille da parte delle integrine, la parziale digestione delle fibrille in piccoli frammenti e la successiva fagocitosi, la formazione di un fagolisosoma e la digestione intercellulare da parte degli enzimi lisosomiali (catepsine).

L'elastina è una proteina strutturale prodotta dai fibroblasti e dalle cellule muscolari lisce sottoforma di tropoelastina che conferisce capacità di stiramento e di ritorno elastico ai tessuti. Viene assemblata a formare fibre elastiche o lamine discontinue, grazie all'associazione in microfibrille delle glicoproteine *fibrillina-1*, *fibrillina-2*, e altre microfibrille associate alle glicoproteine. Queste fungono da supporto strutturale per l'accumulo di elastina e per l'assemblaggio di altre fibre elastiche. Nei tessuti infatti le fibre elastiche mature si dispongono in periferia creando un core di elastina circondato da un manicotto di microfibrille, mentre quelle immature sono composte esclusivamente da subunità microfibrillari e prendono il nome di "fibre ossitalaniche" [107].

2.1.3. *La sostanza fondamentale*

La sostanza fondamentale è un materiale amorfo e trasparente con proprietà di un gel semifluido. Essa è costituita da una miscela di sette differenti tipi di lunghe catene polisaccaridiche non ramificate, ognuna formata dalla ripetizione di un disaccaride fondamentale, il GAG. Queste macromolecole interagiscono con la componente cellulare e fibrillare e sono coinvolte nell'adesione e nei pathway di segnalazione cellulare. Essendo altamente idratata, la sostanza fondamentale regola il contenuto di acqua nei tessuti e la diffusione di nutrienti, dei prodotti di scarto e di altre molecole [108].

La matrice contiene due compartimenti principali: a) la membrana basale e b) la matrice interstiziale. La membrana basale, grazie alle integrine, collega le cellule epiteliali all'ECM interstiziale e ad altri tessuti. La matrice interstiziale occupa lo spazio extracellulare tra l'epitelio ed i tessuti circostanti. Il collagene è la proteina più abbondante nell'ECM interstiziale, sebbene molte macromolecole non collagene, tra cui elastina, fibronectina, tenascina o laminina, svolgano ruoli cruciali all'interno di tale compartimento. Tutti i componenti della matrice interstiziale contengono

domini di legame per altre macromolecole e recettori di membrana cellulare, per svolgere i loro ruoli strutturali e di segnalazione [106].

I proteoglicani sono un grande gruppo di macromolecole extracellulari ed associate alla superficie, sintetizzate dai fibroblasti e composte da un core proteico a cui si ancorano le catene di GAG. La funzione principale è rappresentata dalla loro capacità di legare fattori di crescita, citochine e altre molecole biologicamente attive, come alcuni membri della famiglia del FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor) ed HGF (Hepatocyte Growth Factor). Alcuni proteoglicani modulano l'attività dei fattori di crescita o fungono da co-recettori; inoltre, sono in grado di attrarre grandi volumi di acqua e ioni carichi positivamente, conferendo turgore al tessuto connettivo. L'acido ialuronico è il GAG più abbondante del tessuto stromale, specie nei tessuti lassi embrionali e nella cartilagine ed è l'unico che non presenta gruppi solfato, tuttavia, esso può formare legami covalenti con i proteoglicani a costituire complessi molecolari ancora più grandi.

Le glicoproteine strutturali sono un gruppo di molecole specializzate della ECM che comprendono due tipi di molecole formanti fibrille, la fibrillina e la fibronectina, e un gruppo di proteine non filamentose, fra cui la laminina, la tenascina e l'entactina, che fungono da ancoraggio fra le cellule e la matrice. La fibronectina è la glicoproteina più abbondante della ECM e del plasma, sintetizzata da epatociti e fibroblasti e coinvolta nel deposito e nell'orientamento del collagene nella ECM e nel legame fra le cellule e la matrice [107].

2.2. CARATTERISTICHE DELLO STROMA CONNETTIVALE TUMORALE

Una neoplasia invasiva è stata definita come uno "squilibrio nel corretto ordinamento delle popolazioni cellulari, tale da violare i normali confini tissutali" che richiede una relazione bidirezionale fra lo stroma dell'organo ospite e l'epitelio tumorale [109].

Inoltre, lo stroma tumorale rappresenta una componente vitale ed attiva del sistema di crescita tumorale. Le prime ricerche riguardanti i cambiamenti dello stroma durante lo sviluppo neoplastico risalgono alla prima metà del 1900, quando gli studi pionieristici di Orr J.W. diedero prova definitiva che alcuni cambiamenti stromali avvengono ben prima che il tumore sia chiaramente diagnosticabile, e che questi cambiamenti comportano implicazioni funzionali importanti nell'avanzamento del processo neoplastico. Inoltre, in alcuni tipi di tumori, come neoplasie pancreatiche, gastriche, colon rettali e mammarie, è stato dimostrato come lo stroma rappresenti fino al 60-90% dell'intera massa tumorale [104].

Lo stroma tumorale è composto principalmente da cellule non-maligne associate al tumore, quali fibroblasti associati al tumore (CAF), cellule mesenchimali differenziate, cellule immunitarie, cellule endoteliali e periciti, insieme alla matrice, composta principalmente da proteine strutturali (collagene ed elastina), glicoproteine (fibronectina e tenascina-C) e proteoglicani, e molecole extracellulari [110]. Sebbene nessuna di queste cellule sia maligna di per sé, la presenza di un microambiente tumorale garantisce la possibilità di acquisizione di un fenotipo anomalo che può risultare in alterazioni permanenti della funzionalità cellulare [111].

Alla fine del secolo scorso, Dvorak J. fornì prove delle somiglianze fra lo stroma tumorale e lo stroma lesionale (delle ferite tissutali). Entrambi i tessuti presentano angiogenesi attiva, numerosi fibroblasti in proliferazione, secernenti molecole complesse della matrice, depositi di fibrina e numerose cellule immunitarie. Pertanto, lo stroma tumorale è stato comunemente definito come uno stroma “attivo” o “reattivo” [112]. Nelle ferite in riparazione, il diretto contatto fra cellule stromali ed infiammatorie, mediato dalle molecole di adesione ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), e la risposta ai fattori secreti direttamente dalla mucosa danneggiata, come FGF-2, TGF- β , EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), sono responsabili della conversione da fibroblasti “quiescenti” a fibroblasti “attivi”. Questi sembrerebbero originare da un pool di fibroblasti locali richiamati per la riparazione tissutale; tuttavia, la fonte esatta di queste cellule non è stata ancora definita. Durante la riparazione, i fibroblasti attivati incrementano la loro capacità proliferativa e secretoria, producendo elevati livelli di proteine, fattori di crescita e chemiotattici, e coordinando il flusso di cellule infiammatorie e di progenitori vascolari nel sito danneggiato. Inoltre, mediante l’espressione di α -SMA (Alpha-Smooth Muscle Actin) migrano nella area del danno e si contraggono per mediare la guarigione; infine, a riparazione avvenuta, il loro numero si riduce drammaticamente. Tuttavia, non è chiaro se i fibroblasti attivati ritornino in uno stato inattivo e rimangano nel tessuto oppure se vengano eliminati e rimpiazzati con fibroblasti dei tessuti normali adiacenti [105].

Le interazioni tra cellule maligne e non maligne creano un microambiente tumorale che influenza lo sviluppo e la progressione del cancro. Le alterazioni genetiche acquisite durante lo sviluppo di una neoplasia, modificano il compartimento stromale del tessuto ospite generando un ambiente permissivo che supporta la formazione di cellule maligne. La matrice dello stroma tumorale presenta un’organizzazione alterata, risultando in una struttura più rigida e contrattile di quella dello stroma non maligno e, tra i vari effetti, può creare una barriera fisica che ostacola, mediante l’aumento della pressione interstiziale e la riduzione della densità capillare, la diffusione degli agenti terapeutici alle cellule tumorali. Infine, la sua concentrazione e il suo gradiente di adesione possono determinare la velocità con cui le cellule tumorali migrano da una regione all’altra [108].

I fibroblasti rappresentano le cellule principali dello stroma tumorale, ed in alcune lesioni costituiscono la componente cellulare predominante rispetto all'intero pool di cellule neoplastiche [113]. I CAF sono cellule costantemente attive, che non subiscono né il ritorno a cellule quiescenti né apoptosi, ma mostrano elevate capacità proliferative, migratorie e secernenti. Sembrerebbero essere presenti differenti sub-popolazioni di fibroblasti stromali in relazione all'espressione di specifici markers e fattori di crescita. Questa eterogeneità sarebbe parzialmente imputabile alla loro diversa origine [106, 110, 112]. Secondo le differenti teorie, questi potrebbero originare dall'attivazione di fibroblasti residenti, da cellule neoplastiche locali o cellule epiteliali in transizione epitelio-mesenchimale, o per migrazione e attivazione di cellule del midollo osseo. L'origine ed il meccanismo di attivazione potrebbero dipendere dal tipo di tessuto e potrebbero coinvolgere differenti tipi cellulari e segnali di attivazione. A supporto della prima ipotesi, dati sperimentali mostrano come il TGF- β sia in grado di indurre l'espressione di α -SMA da parte dei fibroblasti residenti; tuttavia, non risulta chiaro se le cellule attivate sperimentalmente acquisiscano altre caratteristiche dei CAF e se il loro fenotipo rimanga costantemente attivo. La seconda ipotesi suggerisce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) di un pool di cellule epiteliali neoplastiche capaci di acquisire abilità migratorie ed invasive. Tuttavia, solo una piccola quota di cellule neoplastiche e stromali sembrano condividere alterazioni genetiche simili; pertanto, tale ipotesi potrebbe essere riservata solamente ad un sottogruppo di CAF. Inoltre, queste mutazioni genetiche potrebbero rappresentare una risposta indipendente dei CAF al microambiente tumorale. Infine, recenti studi hanno dimostrato come precursori cellulari derivati dal midollo osseo possano comportarsi come CAF. Tuttavia, anche in questo caso, non è chiaro se la loro attivazione dipenda dal microambiente tissutale o se queste rappresentino un sottogruppo di cellule del midollo con fenotipo attivato alterato, reclutate preferenzialmente nel sito tumorale. Attualmente, l'ipotesi più accreditata ritiene che i principali progenitori dei CAF siano i fibroblasti locali [104-106, 112].

2.3. RUOLO DELLO STROMA TUMORALE NELLA PROGRESSIONE NEOPLASTICA DI MALATTIA

La formazione di uno specifico stroma tumorale nel sito di invasione tumorale attiva viene considerato parte integrante della progressione neoplastica, tanto da essere definito con il nome di "stromatogenesi tumorale" [110]. Il passaggio da uno stadio di malattia in situ ad una malattia localmente invasiva è cruciale per la crescita tumorale e richiede la violazione della membrana basale. Questo processo espone le cellule neoplastiche ad un contatto diretto con lo stroma tumorale attivo contenente fibroblasti, infiltrato infiammatorio e capillari neoformati.

Tali interazioni comportano variazioni delle vie di segnalazione che influenzano sempre più attivamente il microambiente tumorale. Durante l'invasione locale, le interazioni bidirezionali tra i componenti del tessuto epiteliale e stromale creano una "zona di interfaccia" dove si verifica un intenso rimodellamento tissutale e dove vengono richiamate costantemente cellule progenitrici di fibroblasti. In particolare, sembrerebbe che i CAF localizzati nell'interfaccia tumore-stroma stimolino maggiormente la progressione tumorale rispetto a quelli presenti all'interno del core neoplastico [114].

Nello stroma tumorale attivo, i CAF producono maggiori quantità di collagene, specie di tipo I e IV, fibronectina e proteoglicani, proteine acide e ricche in cisteina, tenascina-C, fattori di crescita del tessuto connettivo, e attivatori del plasminogeno. Inoltre, sono importanti fonti di proteasi che degradano la matrice permettendo alle cellule neoplastiche di infiltrare i tessuti sottostanti e sviluppare proprietà invasive. La secrezione di fattori di crescita, chemochine e citochine, da parte dei CAF e delle cellule immunitarie, rappresenta uno stimolo di crescita diretto per le cellule neoplastiche, un mezzo di comunicazione fra cellule stromali e tumorali ed un segnale di risposta per le cellule progenitrici. Infatti, è stato dimostrato che lo stroma tumorale può indurre l'acquisizione di proprietà staminali nelle cellule neoplastiche, fornendo una nicchia fertile in cui le cellule tumorali primarie possono crescere e le cellule tumorali metastatiche possono colonizzare. A loro volta, le cellule maligne sono in grado di influenzare e attivare lo stroma ben prima di oltrepassare la membrana basale [103]. Risultati di studi istopatologici mostrano come nei primi stadi della carcinogenesi sia evidente una progressiva disorganizzazione dello stroma tumorale ancora prima che sia rilevabile una displasia epiteliale e con la progressione della lesione attraverso stadi displastici e neoplasie in situ le alterazioni diventano via via più consistenti [104, 110].

Un ruolo fondamentale è svolto dai fattori di crescita pro-fibrotici, come il TGF- β , il PDGF e l'FGF-2, che determinano il volume e la composizione dello stroma tumorale, mediano la proliferazione e l'attivazione dei fibroblasti, e inducono la differenziazione cellulare verso un fenotipo "anomalo", l'evasione dall'immuno-sorveglianza e l'accumulo di tessuto fibroso desmoplastico [112, 113]. Questi fattori, insieme alla famiglia delle proteine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), svolgono un ruolo significativo anche nell'angiogenesi [110]. Il VEGF è il principale fattore di crescita coinvolto nella formazione di vasi tumorali, nel rimodellamento della matrice e nella produzione di citochine pro-infiammatorie. È secreto direttamente nello stroma, sia dalle cellule tumorali, sia dai fibroblasti, che dalle cellule infiammatorie, specie in situazioni di ipossia tissutale, ed è responsabile della formazione di nuovi vasi che appaiono di forma e distribuzione irregolare. L'aumento della pressione interstiziale e dell'ipossia tissutale stimolano ulteriormente il richiamo di CAF e la produzione di VEGF [105].

Inoltre, l'abilità delle cellule tumorali di evadere la morte cellulare programmata deriva da segnali di sopravvivenza forniti dal compartimento stromale, come la produzione di IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) ed IGF-2 [113].

Oltre ai CAF e alle cellule endoteliali, altro componente principale del microambiente tumorale sono le cellule immunitarie. In particolare, i macrofagi associati al tumore (TAM) promuovono la crescita neoplastica mediante la produzione di varie molecole che stimolano il rimodellamento tissutale, come EGF, MMP9, MT1-MMP e MMP2, e di molecole pro-infiammatorie, come TNF- α (Tumor necrosis Factor), CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10) e IL-1 (Interleukin 1). Inoltre, supportano la diffusione metastatica e possono sopprimere i meccanismi e le risposte immunitarie antitumorali [108].

Oltre alla loro natura reattiva, le cellule stromali possono subire cambiamenti genetici. Mutazioni nei geni oncosoppressori TP53 e PTEN sono state riscontrate nello stroma di alcuni tumori umani. L'esaurimento dell'APC (Antigen Presenting Cell) nel compartimento stromale è stato collegato allo sviluppo di cancro dell'endometrio in un modello murino e la mutazione attivante della β -catenina negli osteoblasti sembrerebbe precedere lo sviluppo di leucemia mieloide acuta. Questi dati indicano che le mutazioni potrebbero verificarsi nelle cellule stromali ancor prima che nelle cellule tumorali, guidando successivamente la tumorigenesi [106]. Tuttavia, ad oggi non è chiaro se i cambiamenti nelle proprietà stromali precedano o siano il risultato dell'iperproliferazione delle cellule epiteliali trasformate, ed i meccanismi e le tempistiche di reclutamento ed attivazione dei fibroblasti nella fase pre-invasiva sono ancora poco conosciuti. Certamente la disregolazione della segnalazione chimica e della proliferazione cellulare in un tessuto altrimenti omeostatico provoca modificazioni allo stroma tissutale circostante e modifiche meccaniche alla membrana basale. Inoltre, cellule immunitarie, miRNA, prodotti dalla massa crescente di cellule epiteliali trasformate, e segnali meccanici derivanti da un aumento della tensione dei tessuti, rappresentano potenziali fonti di attivazione di fibroblasti. Alcuni studi hanno dimostrato come l'attivazione delle cellule stromali avvenga in uno stadio pre-invasivo di malattia e che lo stroma tumorale venga "preparato" alle fasi successive di sviluppo tumorale [104]. I CAF, mediante produzione di TGF- β e HGF, partecipano anche ai processi di invasione, inducendo la EMT delle cellule tumorali ed un ampio rimodellamento della matrice grazie alla secrezione di proteasi. A tal proposito, è stato dimostrato che l'impiego di fibroblasti ingegnerizzati per sovraesprimere TGF- β e/o HGF sono capaci di promuovere la proliferazione di cellule epiteliali in vitro e di indurre la crescita tumorale in vivo quando trapiantati in un modello murino. Inoltre, i CAF circolanti nel sistema vascolare potrebbero svolgere un ruolo nella preparazione di una nicchia tumorale premetastatica, anche se questo deve ancora essere stabilito con certezza [105].

Infine, in seguito ad invecchiamento cellulare, i CAF vanno incontro a senescenza, caratterizzata dal declino della capacità proliferativa e da un aumento della capacità secretoria. Inoltre, possono acquisire fenotipi alternativi noti come “fenotipo secretorio associato alla senescenza” (SASP), caratterizzati dalla secrezione di fattori molecolari e metaboliti con effetti pro-oncogenetici, ad esempio IL-8 e MMP2 [104, 106].

2.4. RUOLO DELLO STROMA TUMORALE NEL CARCINOMA ORALE

Gli studi storici di Dawe C.J. sulle neoplasie della ghiandola salivare sottomandibolare indotte dal polyomavirus nei roditori hanno dimostrato come l'unità che risponde allo stimolo neoplastico non è semplicemente la cellula epiteliale ma il complesso epitelio-mesenchimale [115].

Nel carcinoma orale tale postulato è stato supportato da recenti studi che mostrano come il parenchima tumorale alteri le caratteristiche dello stroma circostante e come lo stroma tumorale sia direttamente associato a cambiamenti nelle caratteristiche biologiche e morfologiche delle cellule epiteliali neoplastiche, quali la proliferazione, l'invasione, la capacità di riassorbimento osseo e la morfologia neoplastica, sia in vitro sia in vivo. In particolare, è stato dimostrato che a sette giorni la co-coltura della linea cellulare HSC-2 di OSCC con terreno stromale condizionato ha aumentato significativamente il tasso di proliferazione cellulare, l'attività proliferativa e la capacità invasiva della linea stessa, sia rispetto al gruppo di controllo (nessun condizionamento) sia rispetto a gruppi co-coltivati con fibroblasti normali. Sia il numero di cellule tumorali infiltranti sia il numero di cellule stromali, valutati mediante doppia colorazione fluorescente, sono risultati significativamente superiori nelle linee cellulari condizionate. Confrontando la morfologia dei nidi tumorali infiltranti in vivo è emerso come cellule neoplastiche condizionate tendano a formare un elevato numero di piccoli nidi tumorali moderatamente differenziati con moderato pleomorfismo nucleare e cellulare ed uno stroma denso e dendritico, mentre cellule tumorali coltivate con fibroblasti normali siano caratterizzate da scarsi cluster neoplastici ben differenziati, lieve pleomorfismo cellulare e scarsa crescita stromale. La valutazione in vivo della capacità di riassorbimento osseo delle cellule stromali ha dimostrato come cellule coltivate con fibroblasti normali non inducono riassorbimento osseo, mentre cellule tumorali condizionate producono un marcato riassorbimento in presenza di un elevato numero di osteoclasti nella area riassorbita [116]. Tali dati sono stati confermati anche confrontando modelli di OSCC di natura esofitica ed endofitica generati dalla co-coltura della linea cellulare HSC-2 con medium condizionato. Pertanto, lo stroma tumorale svolge un ruolo essenziale non solo nell'iniziazione neoplastica ma anche nella progressione tumorale e nelle caratteristiche di malignità dell'OSCC, mantenendo le sue proprietà anche nel modello in vivo [116].

Gli stessi Autori hanno mostrato come cellule stromali associate a carcinomi squamocellulari invasivi ed in maniera minore ad istotipo verrucoso abbiano inibito la formazione di nidi tumorali e abbiano promosso la proliferazione, l'invasione e la migrazione delle cellule neoplastiche della linea cellulare HSC-3 di carcinoma orale in vitro. In vivo, le cellule stromali associate a carcinomi invasivi inibiscono la differenziazione delle cellule di OSCC e promuovono la proliferazione, l'invasione ossea e la EMT [117]. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato anche la loro capacità di promuovere l'attivazione osteoclastica in vitro ed il riassorbimento osseo in vivo mediante elevata espressione di RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B-Ligand), PTHrP (Parathyroid Hormone-related Peptide), MMP9 e MT1-MMP9 [118].

Negli OSCC invasivi è stato riscontrato un elevato numero di CAF ed è stata rilevata un'associazione significativa fra l'espressione di α -SMA, ampiamente espresso nei CAF e nei miofibroblasti, e una prognosi scarsa [119]. Un'elevata espressione stromale di α -SMA rappresenta il miglior predittore di mortalità, indipendentemente dallo stadio di malattia. In particolare, il rischio di decesso è risultato 3 volte aumentato rispetto a casi a bassa espressione, i tassi di sopravvivenza medi non hanno raggiunto i 24 mesi e due terzi dei pazienti sono deceduti entro 3 anni dalla diagnosi iniziale. Un'elevata espressione di α -SMA è stata indentificata anche in campioni biotici diagnostici, ipotizzando il potenziale ruolo prognostico di α -SMA nel predire l'aggressività tumorale prima del trattamento definitivo [120]. Al contrario, carcinomi orali verrucosi hanno mostrato una minor percentuale di CAF e miofibroblasti. Analogamente, negli OTSCC, un'alta percentuale di CAF stromali è stata associata ad una prognosi scarsa indipendentemente dallo stadio di malattia [121, 122]. In particolare, la presenza di miofibroblasti stromali è stata associata ad elevato rischio recidive locali (4,4 volte maggiore) e di scarsa sopravvivenza globale [123]. Inoltre, neoplasie linguali metastatiche hanno mostrato il più alto numero di CAF, suggerendo il loro possibile ruolo non solo nell'invasione neoplastica locale ma anche a distanza [122, 124]. In vivo, la presenza di miofibroblasti è stata dimostrata solamente in OTSCC, assenti invece nelle lesioni potenzialmente maligne e displastiche della lingua [125].

Studi in vitro hanno dimostrato come fibroblasti normali in linee cellulari di carcinoma orale vengano attivati grazie all'espressione di TGF- β 1 con ripercussione sulla capacità invasiva e proliferativa delle cellule stesse [126]. In particolare, i CAF presentano una sottopopolazione con prevalente potenziale migratorio, che potrebbe promuovere lo sviluppo di un fenotipo cellulare invasivo, ed una caratterizzata dalla produzione di TGF- β 1, che potrebbe influenzare il processo di EMT [127]. L'aggiunta di fibroblasti a cheratinociti orali normali e displastici ha modificato l'espressione di fattori correlati alla carcinogenesi orale ed ha aumentato la proliferazione cellulare, inducendo un pattern di crescita invasivo nelle cellule neoplastiche [128]. Inoltre, in un modello

organoide 3D coltivato con cellule di carcinoma orale, la maggior parte dei CAF sono stati riscontrati lungo il bordo infiltrativo del tumore ed hanno indotto un significativo aumento della profondità di invasione [129]. Oltre ad un elevato numero di CAF, gli OSCC metastatici hanno mostrato anche alti livelli di fibronectina e tenascina e ridotti livelli di laminina, collagene IV e proteoglicani, principali componenti della membrana basale, rispetto a casi non metastatici.

Esperimenti in vitro su CAF reclutati da cellule staminali mesenchimali del midollo osseo hanno mostrato di promuovere il potenziale invasivo degli OSCC e la up-regolazione di collagene I da parte delle cellule neoplastiche [129]. Inoltre, elevati livelli di MMP-2 e MMP-9, che agiscono come fattori pro-angiogenetici capaci di attivare il rilascio di VEGF e coinvolti nella formazione di una nicchia premetastatica, sono stati correlati ad OSCC con prognosi scarsa [130]. Per quanto concerne la sostanza fondamentale, il cambiamento più rilevante della matrice nelle neoplasie epiteliali è rappresentato dall'aumento della sua rigidità causato dal cross-linking del collagene per alterazione del segnale delle integrine e/o dall'aumentata produzione ed attività del LOX sintetizzato dai CAF [113, 131]. La maggior deposizione di collagene e il maggior turnover dei componenti di matrice risulta più evidente lungo il fronte infiltrativo del tumore e nello stroma ad esso adiacente, associandosi a un aumentato rischio metastatico e a scarsa sopravvivenza globale [132]. Questo suggerisce come il fronte infiltrativo rappresenti probabilmente il sito di massima interconnessione epitelio-mesenchimale.

Infine, la presenza di un'elevata quantità di stroma rappresenta un fattore prognostico avverso nel carcinoma orale. Negli OSCC è strettamente correlata ad una ridotta sopravvivenza specifica da malattia e ad una scarsa sopravvivenza globale [111] e negli stadi iniziali rappresenta un fattore prognostico indipendente di recidiva locoregionale, di mortalità correlata al cancro, e di metastasi linfonodali [133, 134]. Inoltre, una maggior quantità di stroma tumorale è risultata significativamente correlata a fattori di rischio avversi quali infiltrazione in profondità, PNI, LVI, e stadio avanzato di malattia [134, 135]. Risultati analoghi sono emersi anche in casi di carcinoma orale [136-138], nasofaringeo [139], laringeo [140-142] e faringeo [141, 142]. Pertanto, una crescita stromale eccessiva sembra prevedere esiti sfavorevoli di malattia a causa di una secrezione anomala della matrice e una alterata maturazione del collagene.

3. I FATTORI MORFOLOGICI EMERGENTI PER LO STUDIO DELLO STROMA TUMORALE NEL CARCINOMA ORALE

3.1. TUMOR BUDDING

Il tumor budding (TB) è definito come la presenza di cellule tumorali singole o piccoli clusters di cellule singole (≤ 5) disperse nello stroma sul fronte infiltrativo del tumore [143]. Il TB è stato identificato per la prima volta nei tumori del colon-retto e descritto come "de-differenziazione tumorale" poiché tali aree risultavano meno differenziate e le cellule mostravano grandi nuclei e perdita di complessi giunzionali e desmosomi [144]. Successivamente, è stato attribuito il termine "budding" poiché le cellule e i nidi indifferenziati sembravano germogliare da isole tumorali più grandi [145, 146]. Le cellule del TB sono caratterizzate da un fenotipo cellulare dinamico e riflettono due caratteristiche principali di malignità: la perdita di adesione cellulare e l'invasione tumorale attiva, grazie alla capacità di resistere all'apoptosi e di aumentare la degradazione dello stroma peritumorale. Il fronte infiltrativo del tumore è essenziale per la progressione del cancro, rappresentando l'area di invasione attiva e di dialogo incrociato tra tumore e stroma. Pertanto, il TB potrebbe rappresentare un nido di cellule epiteliali in fase di EMT o in de-differenziazione, coinvolte nella riorganizzazione cellulare e nel rimodellamento della ECM per favorire lo sviluppo neoplastico [147, 148]. Per raggiungere un accordo su di uno scoring system standardizzato, l'International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) per il cancro del colon-retto raccomanda la valutazione del TB su sezioni colorate con ematossilina ed eosina, utilizzando il cut-off di 5 buds/campo per stratificare i gruppi di rischio. Per garantire la standardizzazione della dimensione del campo di immagine, l'ITBCC suggerisce la valutazione del TB per area, pari a $0,785 \text{ mm}^2$, corrispondente ad un obiettivo $\times 20$ con un diametro del campo oculare di 20 mm, sviluppando una tabella di conversione per microscopi con diversi campi visivi. Inoltre, il gruppo ITBCC ha raccomandato l'utilizzo del metodo "hotspot", che prevede la scansione di 10 campi separati ($\times 10$) lungo il fronte infiltrativo del tumore ed il calcolo del TB nell'area "hotspot" ($\times 20$). Tuttavia, il conteggio totale del budding andrebbe sempre riportato per evitare la perdita di informazioni. Cellule isolate con nuclei multipli e cellule fusiformi non distinguibili da fibroblasti e/o cellule endoteliali, così come corpi apoptotici e detriti cellulari, non devono essere calcolate [149]. Il primo modello di rischio proposto su campioni di OTSCC è rappresentato dal BD model, un sistema a tre livelli che valuta il TB ed il DOI [150]. Successivamente, tale modello è stato integrato nel iBD model insieme al Glasgow Microenvironment Score, stratificando i pazienti affetti da OTSCC in tre gruppi di rischio [151]. Negli OTSCC precoci, il TB è stato valutato anche

insieme al Grading WHO, nel Revised Grading System [152]. Infine, è stato combinato con il calcolo del TSR [136]. In particolare, è stato sviluppato un metodo di analisi semiautomatica che combina TSR, TB, e quota di linfociti intratumorali (TIL), che ha dimostrato forti correlazioni tra TB, reazione infiammatoria e TSR. Un punteggio elevato di TB si associa ad una scarsa reazione infiammatoria e ad una maggior quantità di stroma tumorale, suggerendo il ruolo critico della reazione stromale e dell'infiammazione locale nello sviluppo neoplastico [153, 154]. La differenziazione e la disseminazione di cellule neoplastiche lungo il fronte infiltrativo tumorale potrebbe essere causata da una diminuzione dell'attività antitumorale locale e da una cospicua quantità di stroma desmoplastico in grado di fornire substrati energetici alle gemme cellulari [151].

3.2. TUMOR-STROMA RATIO

Il rapporto tumore stroma è stato definito come il rapporto tra la quota di cellule epiteliali neoplastiche e lo stroma associato al tumore. Secondo le raccomandazioni proposte da Van Pelt et al., il TSR andrebbe valutato su sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina. Inizialmente, devono essere selezionate a basso ingrandimento ($\times 2,5$ o $\times 5$) le aree lungo il fronte infiltrativo contenenti la maggior percentuale di stroma. Successivamente, deve essere individuata un'area contenente sia tessuto tumorale che stromale, utilizzando un obiettivo $\times 10$, che presenti isole tumorali in tutti i bordi del campo d'immagine selezionato. La quantità di stroma viene stimata in incrementi del 10% per campo di immagine. Lo score finale definisce due gruppi: a) gruppo con stroma-alto in cui la percentuale di area stromale supera il 50% del campo; b) gruppo con stroma-scarso con percentuale di stroma inferiore od uguale al 50% della sezione istologica. La valutazione del TSR non dovrebbe includere zone contenenti tessuto muscolare, mucinoso e ghiandolare, grandi tronchi nervosi e vasi sanguigni ed aree con elevato infiltrato infiammatorio, tessuto necrotico e/o aree di infiammazione neutrofila pura. In caso di eterogeneità tumorale deve essere considerata l'area con la maggior percentuale di stroma. Pertanto, anche la mera presenza di un singolo campo con un punteggio di stroma-alto risulta decisiva [155].

La valutazione del TSR può essere adeguatamente stimata nei pazienti trattati chirurgicamente per una neoplasia maligna epiteliale primitiva. Tuttavia, i pazienti sottoposti a terapia radioterapica e/o chemioterapia neoadiuvante andrebbero esclusi dalla valutazione del TSR poiché tali trattamenti inducono cambiamenti nella morfologia cellulare e nella composizione del microambiente tumorale [155]. Il valore prognostico del TSR è stato validato in diversi tipi di tumori solidi. Tumori epiteliali maligni di pazienti con prognosi sfavorevole mostrano un'elevata proporzione stromale mentre

tumori con abbondante tessuto neoplastico sono associati a prognosi migliore. In particolare, nel OSCC e OTSCC, il TSR risulta significativamente associato a ridotta sopravvivenza globale, specifica da malattia e libera da malattia e correlato con la presenza di fattori di rischio avversi [111, 133, 136, 137].

3.3. IMMUNOFENOTIPO

Uno dei segni distintivi del cancro è la capacità delle cellule tumorali di eludere il sistema immunitario dell'organismo ospite [156, 157]. In particolare, i TIL e la loro organizzazione spaziale nel microambiente tumorale svolgono un ruolo critico nella progressione neoplastica [158], tanto che l'International TIL Working Group, raccomanda la stima percentuale, in incrementi del 10%, della densità e della localizzazione delle cellule mononucleate sia nel compartimento stromale peritumorale, sia all'interno della massa tumorale, escludendo le aree necrotiche ed ulcerate. Inoltre, Chen D.S. e Melman I. hanno classificato istologicamente i tumori solidi in tre profili immunitari secondo la distribuzione dei linfociti T. Le tre categorie vengono così definite: a) fenotipo immuno-infiammato, caratterizzato dalla presenza di un denso infiltrato di cellule immunitarie, linfociti T CD4+ e CD8+, spesso accompagnati da cellule mieloidi e monociti in prossimità delle cellule tumorali; b) fenotipo immuno-escluso, caratterizzato dalla presenza di cellule immunitarie che non penetrano nel parenchima neoplastico ma vengono trattenute nello stroma tumorale; c) fenotipo immuno-deserto, caratterizzato dall'assenza quasi totale di linfociti sia nel parenchima che nello stroma tumorale [159]. Nonostante la comprovata efficacia dell'immunoterapia nel trattamento di tumori solidi, solamente una minoranza di pazienti mostra risposte consistenti. In particolare, il fenotipo immuno-infiammato risponde frequentemente ma non necessariamente all'immunoterapia. Pertanto, l'infiltrazione delle cellule immunitarie sembrerebbe necessaria ma non sufficiente ad indurre una risposta terapeutica. Anche il fenotipo immuno-escluso suggerisce la presenza di una risposta immunitaria antitumorale, resa però inefficace dall'invasione dello stroma tumorale o dalla ritenzione di cellule immunitarie nello stroma. Infine, il fenotipo immuno-deserto, scarsamente responsivo a terapia, riflette l'assenza di una risposta immunitaria antitumorale preesistente. È chiaro che la valutazione della distribuzione delle cellule T prima del trattamento possa facilitare il riconoscimento dei pazienti più suscettibili ad immunoterapia, che tenta di ripristinare la preesistente risposta immunitaria antitumorale ospite bloccando i checkpoint immunitari proprio per riattivare la risposta antitumorale delle cellule T. Tuttavia, la continua evoluzione del microambiente tumorale limita la piena comprensione della risposta immunologica individuale

[160]. Nel carcinoma orale, elevati livelli di linfociti T sono risultati associati ad una prognosi favorevole [161-164], mentre la scarsa densità stromale di TIL rappresenta un fattore prognostico indipendente di scarsa sopravvivenza globale [165]. In campioni di OTSCC, il fenotipo immuno-deserto è risultato fattore prognostico indipendente di scarsa sopravvivenza globale e specifica da malattia [166, 167], imputabile al reclutamento difettoso di cellule presentanti l'antigene, alla mancata attivazione e/o migrazione dei linfociti T nei tessuti tumorali o all'alterata produzione di citochine. Al contrario, la distinzione tra il fenotipo immuno-infiammato ed immuno-escluso non è netta, poiché nello stesso campione è stato osservato un continuum di valori relativi al grado di infiltrazione immunitaria correlato al costante crosstalking fra cellule epiteliali neoplastiche e stroma peritumorale [159, 167].

4. SCOPO DEL LAVORO

Come componente principale ed attiva del microambiente tumorale, lo stroma influenza significativamente la crescita del parenchima tumorale, svolgendo un ruolo cruciale nella tumorigenesi, nella progressione neoplastica e nella resistenza alla terapia. Tali effetti sono determinati sia dalle proprietà intrinseche dello stroma, sia da ulteriori proprietà acquisite come parte di una risposta adattativa all'intervento terapeutico. Il concetto "Seed and Soil", proposto da Paget S., della capacità delle cellule tumorali ("seed" = "seme") di crescere solo in alcuni siti secondari a seconda del loro microambiente ("soil" = "suolo"), rimane tutt'ora valido. I tumori rappresentano un ecosistema in cui cellule stromali del microambiente tumorale, interagendo dinamicamente con le cellule neoplastiche, provocano cambiamenti genetici ed epigenetici delle cellule tumorali stesse. Lo stroma, infatti, induce l'acquisizione di proprietà staminali nelle cellule neoplastiche, fornendo una nicchia fertile in cui le cellule tumorali primarie possono crescere e le cellule tumorali metastatiche possono colonizzare. Inoltre, l'attivazione delle cellule stromali sembrerebbe avvenire in uno stadio pre-invasivo di malattia alterando lo stroma ben prima che il tumore sia chiaramente diagnosticabile. Ancora, un'elevata quantità di stroma ha dimostrato di predire efficacemente esiti sfavorevoli di malattia nel carcinoma squamocellulare orale a causa di un'anomala secrezione di matrice e una alterata maturazione del collagene. Pertanto, lo studio si propone di valutare le caratteristiche morfologiche e morfometriche dello stroma tumorale in campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale, mediante analisi di microscopia ottica e di microtomografia a contrasto di fase ad alta risoluzione, al fine di analizzare le modificazioni del microambiente tumorale durante la progressione neoplastica. La valutazione istopatologica ha consentito lo studio delle caratteristiche morfologiche dello stroma tumorale, mentre la microtomografia ha analizzato la sua organizzazione tridimensionale, al fine di studiare la composizione e la struttura della matrice connettivale e la configurazione delle fibre collagene che la compongono.

5. MATERIALI E METODI

5.1. SELEZIONE DEI CAMPIONI CHIRURGICI PER L' ANALISI ISTOPATOLOGICA

Lo studio retrospettivo monocentrico ha incluso pazienti con diagnosi istologica di carcinoma squamocellulare orale della lingua, sottoposti a terapia chirurgica con intento curativo presso il Dipartimento di Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, nel periodo di tempo compreso fra gennaio 1997 e dicembre 2018.

I dati clinico-patologici sono stati raccolti e catalogati dall'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche (sistema ATHENA) e dalle cartelle e dai referti clinici resi disponibili dal Dipartimento di Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria, Ospedali Riuniti di Ancona. La suddetta raccolta è stata eseguita da un singolo operatore al fine di garantire l'uniformità dei dati raccolti.

5.1.1. Criteri di eleggibilità

Sono stati inclusi unicamente soggetti: a) con diagnosi istopatologica di carcinoma squamocellulare orale della lingua di natura primitiva (definito in base ai codici di diagnosi dell'International Classification of Disease-10: C02.0, C02.1, C02.2 e C02.3); b) età maggiore di 18 anni; c) non sottoposti a chemioterapia e/o terapia radioterapica neoadiuvante; d) negativi per infezione da HPV, valutata mediante indagine di ibridazione fluorescente in situ specifica per HPV-16 ed indagine di immunoistochimica con anticorpo anti-CDKN2A/p16Ink4a; e) follow-up clinico-radiografico della durata minima di 3 anni; f) disposizione di materiale biologico idoneo e sufficiente ad un'adeguata valutazione istopatologica e microtomografica; g) completezza dei dati clinico-patologici. I criteri di esclusione hanno compreso soggetti: a) con diagnosi istopatologica di carcinoma squamocellulare orale della lingua di natura recidivante o di secondo tumore primitivo; b) con diagnosi di OTSCC coinvolgente anche altre sedi del cavo orale o in cui non sia stato possibile accertare la sede esatta di origine della neoplasia; c) con accertamento di decesso post-operatorio.

Per ogni caso, sono state predisposte sezioni seriali di 4 µm di spessore, colorate con ematossilina-eosina, ottenute da campioni chirurgici fissati in formalina ed inclusi in paraffina, non decalcificati, contenenti la parte più invasiva del tumore primario, ovvero la medesima analizzata durante la diagnostica di routine per la determinazione della profondità di invasione tumorale. Successivamente, per confermare la diagnosi iniziale, ogni campione è stato rivalutato

istologicamente e riclassificato da due patologi orali esperti, secondo la 4° Edizione della “Classification of Head and Neck Tumours” (WHO) e l’8° Edizione del “Cancer Staging Manual” (AJCC). I campioni chirurgici sono stati ulteriormente stratificati per allocare lo stesso numero di casi in ogni gruppo di stadio patologico (I, II, III, IV). Il follow-up clinico-radiografico è stato eseguito da un singolo operatore in cieco ai dati clinico-patologici ed al gruppo di allocazione. Nel primo anno post-operatorio, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un follow-up clinico-radiografico bimestrale, seguito da un follow-up a cadenza trimestrale durante il secondo anno e semestrale a partire dal quarto anno post-operatorio, stabilendo un periodo massimo di follow-up pari a 10 anni. Qualora il paziente abbia manifestato segni o sintomi di sospetta recidiva, è stata immediatamente programmata una visita di controllo.

5.1.2. Raccolta dei dati clinici

Di ogni paziente sono stati raccolti e catalogati i seguenti dati clinici: età, data di nascita, genere e data della diagnosi istopatologica, dimensione massima e caratteristiche macroscopiche del tumore, tipologia di intervento chirurgico e status dei margini di resezione, sviluppo di recidive locali e locoregionali di malattia e/o exitus post-operatorio, tempo di sopravvivenza specifica e libero da malattia, tempo di sopravvivenza globale. I dati sono stati raccolti in modo anonimo attribuendo ad ogni paziente un codice alfanumerico progressivo.

5.1.3. Raccolta del consenso informato

Ogni paziente ha sottoscritto il consenso informato, esprimendo parere favorevole affinché i dati clinici, oggetto del trattamento, resi anonimi, ed i campioni biologici, siano utilizzati per scopi di ricerca, epidemiologia didattica, di formazione e studi di patologie. Lo studio è stato condotto secondo i “Principi Etici per la Ricerca Medica Coinvolgente Esseri Umani” della Dichiarazione di Helsinki [168], la checklist REMARK [169] e la Dichiarazione TRIPOD [170]. Inoltre, ha ricevuto approvazione etica da Comitato Etico Regionale delle Marche (CERM 2019-308).

5.2. ANALISI ISTOPATOLOGICA

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

5.2.1. Criteri di valutazione istopatologica dei parametri morfologici

Per ogni caso sono stati valutati e catalogati i seguenti parametri morfologici:

- Grading del fronte infiltrativo secondo la 4° Edizione del WHO: G1) OTSCC ben differenziati caratterizzati dalla presenza di grandi cellule organizzate in grandi isole neoplastiche, prominenti cellule discheratosiche, ponti intercellulari e perle cornee; G2) OTSCC moderatamente differenziati caratterizzati da un pleomorfismo nucleare e cellulare più evidente, maggior prevalenza di mitosi, incluse quelle atipiche, e ridotta cheratinizzazione; G3) OTSCC scarsamente differenziati, contraddistinti da cellule neoplastiche che tendono a formare proiezioni digitiformi, piccole isole cellulari o singole cellule interdisperse nel fronte infiltrativo, scarsa o assente differenziazione squamosa, frequenti mitosi, specie quelle atipiche, e ponti intercellulari appena distinguibili, con una quota significativa di stroma desmoplastico associato ad una risposta infiammatoria ospite attorno ai nidi e/o cellule neoplastiche infiltranti [3] (Figura 10);

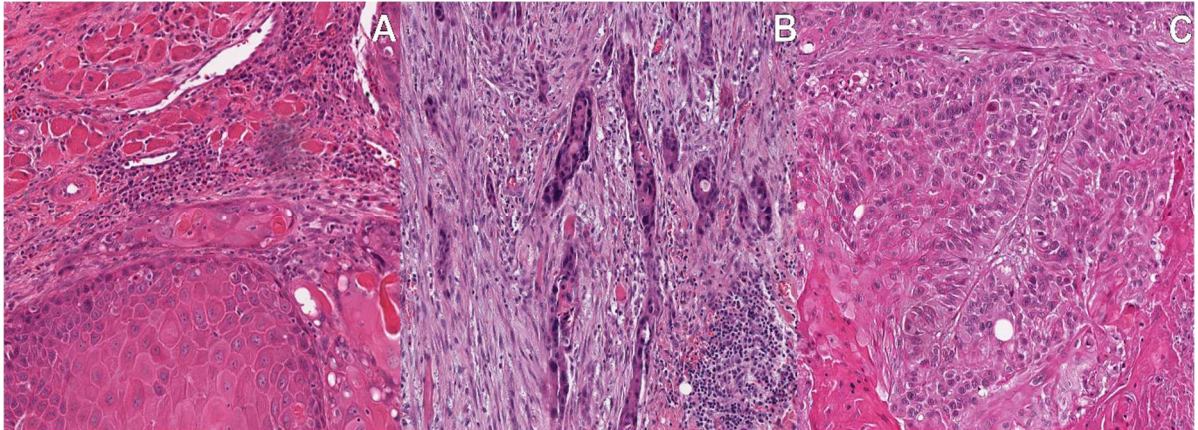


Figura 10. Rappresentazione microscopica del grado di differenziazione istologico prevalente del fronte infiltrativo di tre campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezioni colorate con ematossilina-eosina. A) carcinoma ben differenziato; B) carcinoma moderatamente differenziato; C) carcinoma scarsamente differenziato.

- Profondità di invasione secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC): calcolata su campione chirurgico, in millimetri, mediante stampa di righelli su guide in acetato sovrapponibili alle sezioni istologiche, a partire dalla membrana basale della mucosa sana adiacente al tumore proseguendo per una linea perpendicolare che giunge fino al punto di massima infiltrazione neoplastica. In accordo con le linee guida sono state identificate tre categorie di rischio: neoplasie poco invasive ($DOI \leq 5$ mm), moderatamente invasive (5 mm $< DOI \leq 10$ mm) e altamente invasive ($DOI > 10$ mm) [59] (Figura 11);

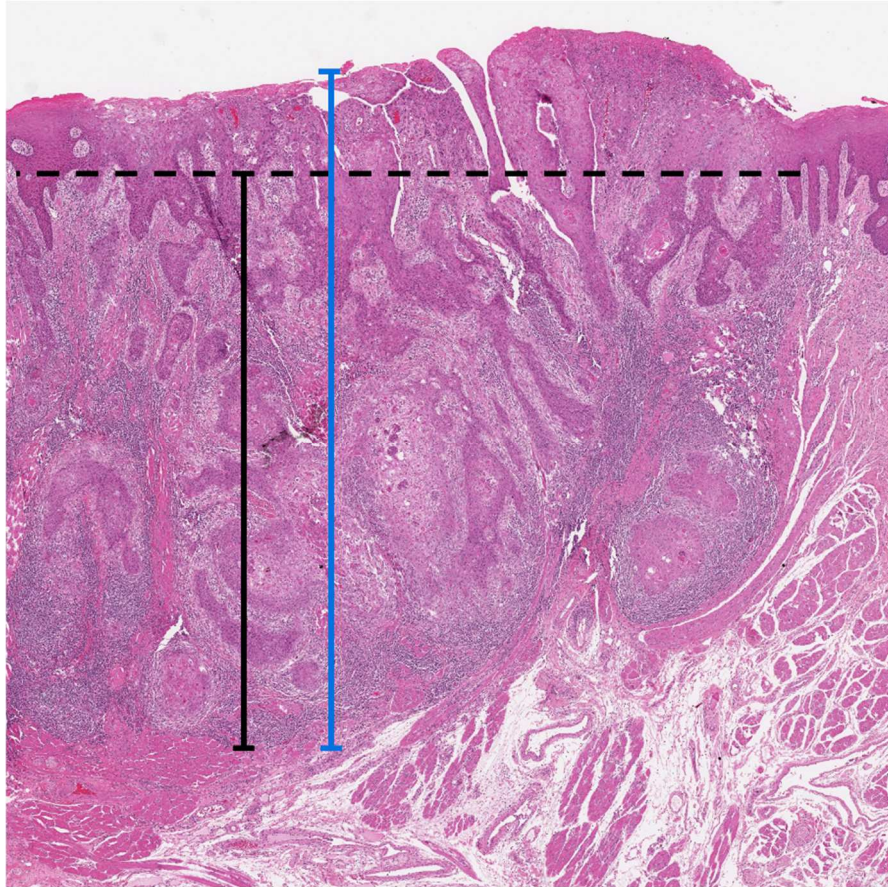


Figura 11 . Rappresentazione istologica della misurazione della profondità di invasione e dello spessore tumorale in un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione colorata con ematossilina-eosina. Le linee colorate in nero definiscono il calcolo della profondità di invasione a partire dalla membrana basale della mucosa sana adiacente al tumore proseguendo perpendicolarmente fino al punto di massima infiltrazione neoplastica. La linea di colore blu definisce lo spessore tumorale più profondo.

- Pattern di invasione secondo Brandwein-Gensler et al.: il POI è stato valutato a basso ingrandimento ($\times 4$) lungo il fronte infiltrativo del tumore, registrando la presenza delle differenti tipologie di pattern presenti. È stato assegnato un valore POI 1 a tumori con bordi infiltrativi compressivi e ben delineati; POI 2 in caso di infiltrazione in cordoni solidi, bande e/o nidi tumorali; POI 3 in presenza di piccoli gruppi o cordoni di cellule infiltranti (> 15 cellule); POI 4 se osservabile una dissociazione cellulare marcata e diffusa di piccoli gruppi cellulari (< 15 cellule) e/o in cellule singole; POI 5 in presenza di satelliti tumorali di qualsiasi dimensione ad una distanza \geq di 1 mm dalla massa tumorale principale o da qualsiasi altro satellite tumorale. Inoltre, per ogni paziente è stato considerato sia il WPOI, definitivo come il valore più elevato ottenuto nella valutazione dei pattern d'invasione, sia il PPOI, definito come il pattern più rappresentativo individuato in ogni paziente [106] (Figura 12);

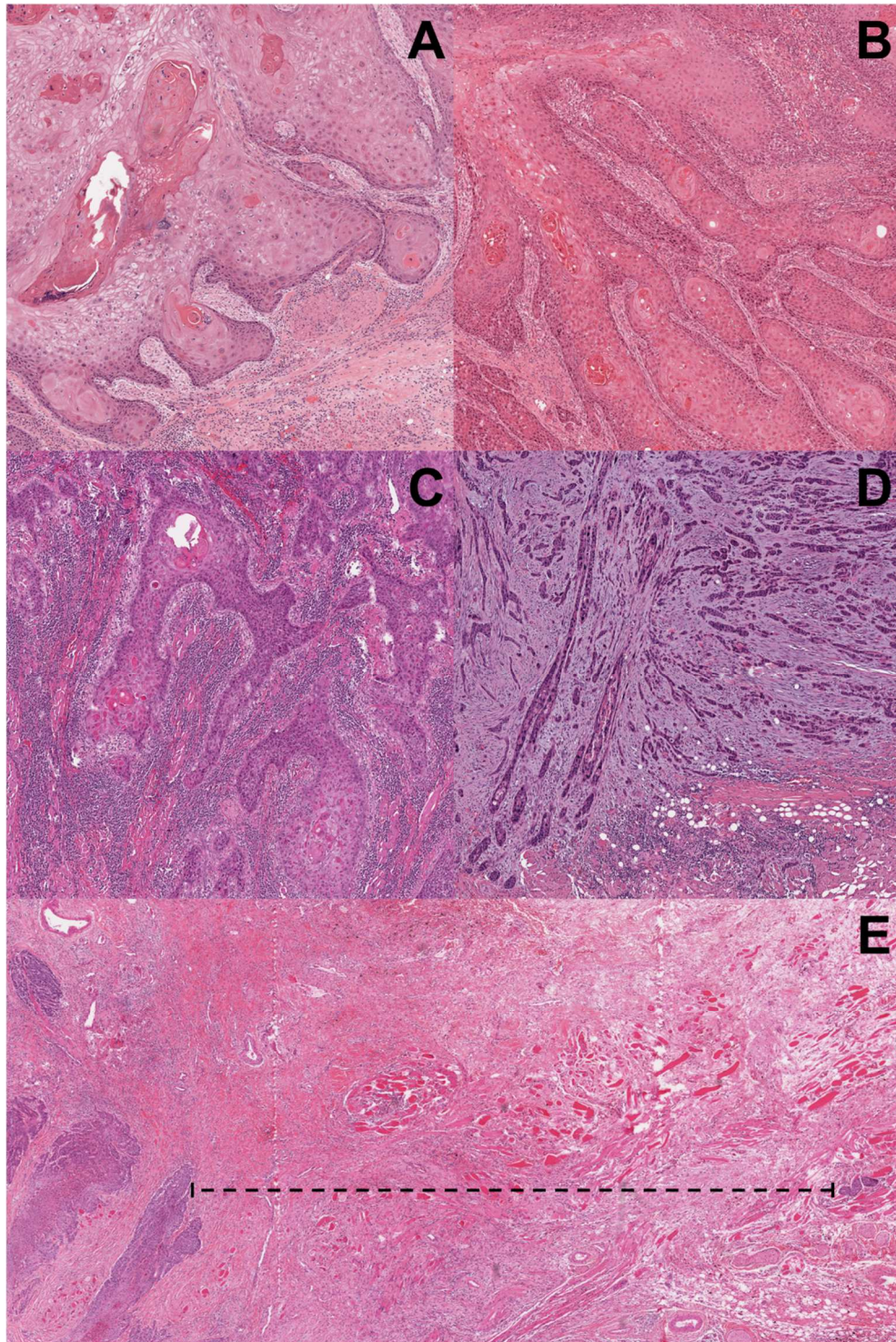


Figura 12. Rappresentazione istologica del pattern di invasione di campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A) POI-1, caratterizzato da un margine d'invasione compressivo e ben delimitato; B) POI-2, caratterizzato da ampi cordoni e nidi solidi; C) POI-3, caratterizzato da piccoli gruppi o cordoni di cellule infiltranti (> 15 cellule); D) POI-4, caratterizzato dalla presenza di dissociazione cellulare marcata e diffusa di piccoli gruppi cellulari (<15 cellule) e/o da cellule singole; E) POI-5, presenza di satelliti tumorali di qualsiasi dimensione distanti almeno 1 mm dalla massa tumorale o da qualsiasi altro satellite tumorale.

- Tumor-Stroma Ratio secondo Mascitti et al.: il fronte infiltrativo tumorale è stato valutato a basso ingrandimento ($\times 4$) per selezionare l'area contenente la maggior percentuale di stroma desmoplastico. Successivamente tale area è stata valutata ad alto ingrandimento ($\times 20$) per individuare un singolo campo visivo che contenesse isole epiteliali neoplastiche in ogni bordo del campo immagine selezionato. La quantità di stroma è stata stimata in incrementi del 10% (10%, 20%, 30%, ecc.) e lo score finale è stato ottenuto dalla media dei risultati forniti dai due patologi. Infine, il TSR è stato classificato in modo dicotomico, considerando il livello soglia ottimale di percentuale di carcinoma, determinato da Mesker et al., in base al potere massimo discriminante di sopravvivenza globale e libera da malattia: a) Stroma-alto in cui la percentuale media di stroma supera il 50% del campo; b) Stroma-scarso in cui la percentuale media di stroma risulta minore o uguale al 50% della sezione istologica [171]. Nella determinazione del TSR non state incluse zone contenenti tessuto muscolare, mucinoso e ghiandolare, grandi tronchi nervosi e vasi sanguigni ed aree con elevato infiltrato infiammatorio, tessuto necrotico e/o aree di infiammazione neutrofila pura [111] (Figura 13);

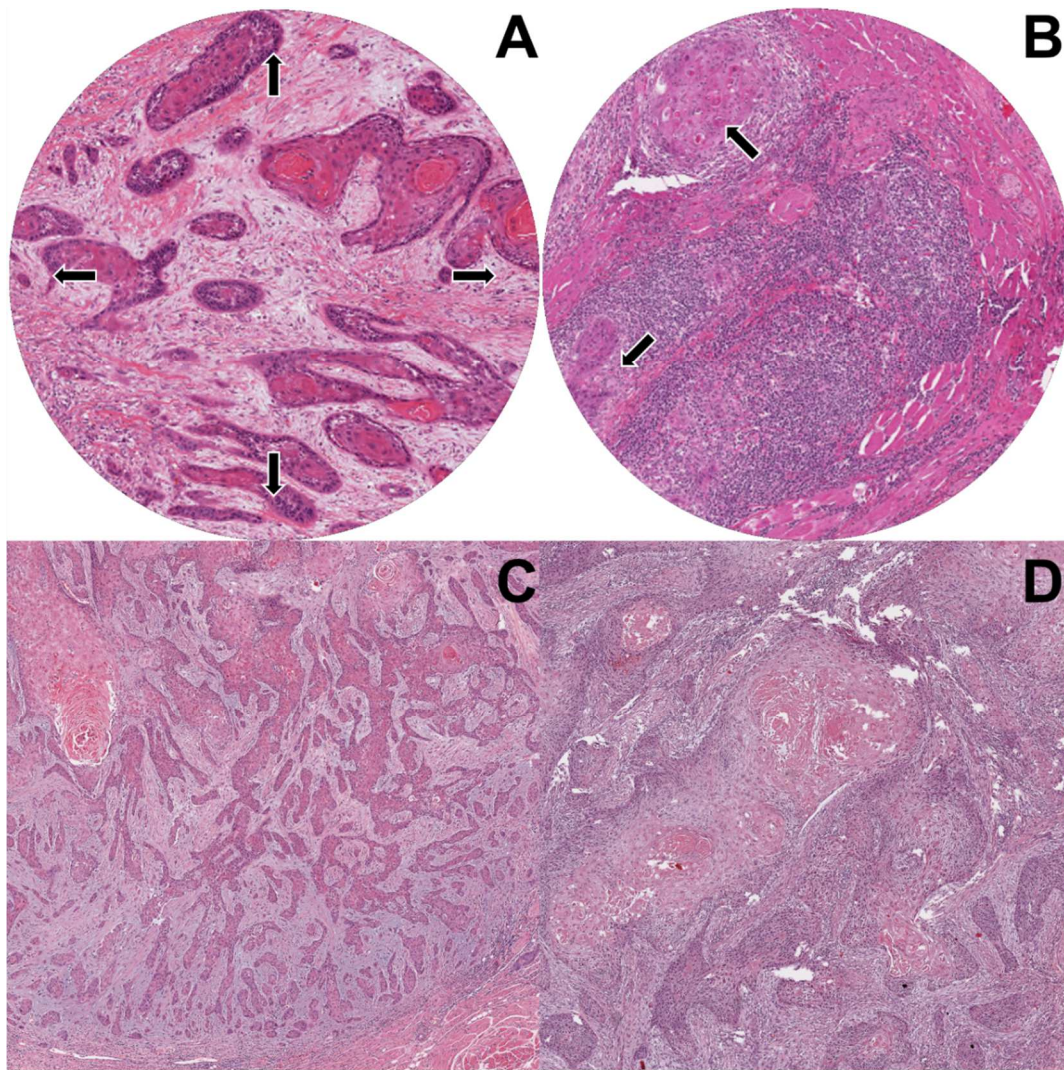


Figura 13. Rappresentazione istologica del Tumor Stroma Ratio in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A) Campo visivo correttamente individuato in presenza di nidi cellulari tumorali lungo tutti i bordi del campo di immagine; B) presenza di cellule tumorali solamente lungo una parte del bordo del campo di immagine; C) Immagine istologica esemplificativa di TSR basso; D) immagine istologica esemplificativa di TSR alto.

- Tumor Budding: il fronte infiltrativo è stato valutato a basso ingrandimento ($\times 4$) per selezionare l'area contenente il maggior numero di foci di budding ("area hotspot") in cui il numero di TB è stato calcolato ad alto ingrandimento ($\times 20$) [149] (Figura 14). I pazienti sono stati categorizzati in gruppi di rischio a seconda del valore di cut-off utilizzato, considerando gli scoring system maggiormente riportati in letteratura. In particolare, è stato utilizzato il sistema a due livelli descritto da Wang et al. (TB1), che considera il limite di 5 buds/campo (TB basso: < 5 buds/campo, TB alto: ≥ 5 buds/campo) [172], il sistema a due livelli proposto da Seki et al. (TB2), che adotta il cut-off di 3 buds/campo (TB basso: < 3 buds/campo, TB alto: ≥ 3 buds/campo) [173], ed il sistema a tre livelli di Lugli et al. (TB3),

che propone due cut-off di 5 buds/campo e di 10 buds/campo (TB basso: < 4 buds/campo, TB intermedio: 5-9 buds/campo, TB alto: ≥ 10 buds/campo) [149]. Inoltre, sono stati adottati due modelli di rischio che includono il TB quali: il BD Model (BD0: DOI < 4 mm e TB < 5 buds/campo, BD1: DOI ≥ 4 mm e TB < 5 buds/campo o DOI < 4 mm e TB ≥ 5 buds/campo, BD2: DOI ≥ 4 mm e TB ≥ 5 buds/campo) [150] ed il Revised Grading system (RG1: tumore ben differenziato senza TB, RG2: tumore moderatamente differenziato con TB < 5 buds/campo, RG3: tumore scarsamente differenziato con TB ≥ 5 buds/campo) [152]. Infine, è stato riportato il numero totale di foci di tumor budding calcolati nell'area hotspot ad alto ingrandimento;

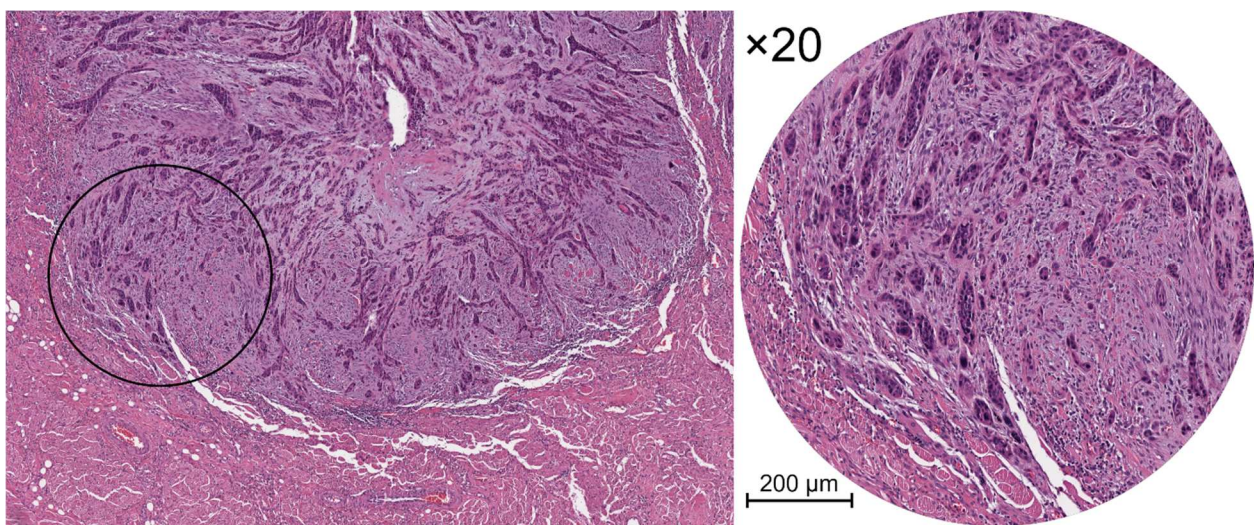


Figura 14. Rappresentazione istologica della valutazione del tumor budding in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A sinistra: selezione dell'area hotspot lungo il fronte infiltrativo a basso ingrandimento; A destra: calcolo del tumor budding nell' area hotspot del fronte infiltrativo ad alto ingrandimento.

- Immunofenotipo: la densità e la localizzazione dei linfociti è stata determinata in accordo con le raccomandazioni dell'International TILs Working Group. Il campione istologico è stato valutato interamente a basso ingrandimento (x 4); successivamente, 5 campi ad alto ingrandimento ($\times 20$) sono stati selezionati casualmente. La presenza dei TIL è stata valutata nello stroma all'interno dei bordi infiltrativi del tumore considerando tutte le cellule mononucleate presenti. Le aree necrotiche sono state escluse dal campo di immagine ed in caso di mancata possibilità di esclusione non sono state considerate per l'attribuzione del punteggio. La quota di TIL è stata stimata in base alla percentuale di area occupata dalle cellule mononucleate nello stroma, sia attorno al bordo tumorale sia all'interno della massa tumorale in prossimità delle cellule neoplastiche, in incrementi del 10%. Lo score finale è risultato dalla media dei risultati forniti nei 5 campi [174]. I pazienti sono stati categorizzati

in 3 gruppi: fenotipo immuno-infiammato (la percentuale media di linfociti presenti all'interno della massa tumorale in prossimità delle cellule neoplastiche è $\geq 10\%$, indipendentemente dalla presenza di linfociti nell'area stromale attorno al bordo tumorale), fenotipo immuno-escluso (la percentuale media di linfociti dell'area stromale attorno al bordo tumorale è $\geq 10\%$, con trascurabile quota [$< 10\%$] di linfociti all'interno della massa tumorale) e fenotipo immuno-deserto (massa tumorale e stroma presentano una trascurabile percentuale di linfociti, $< 10\%$) [167] (Figura 15);

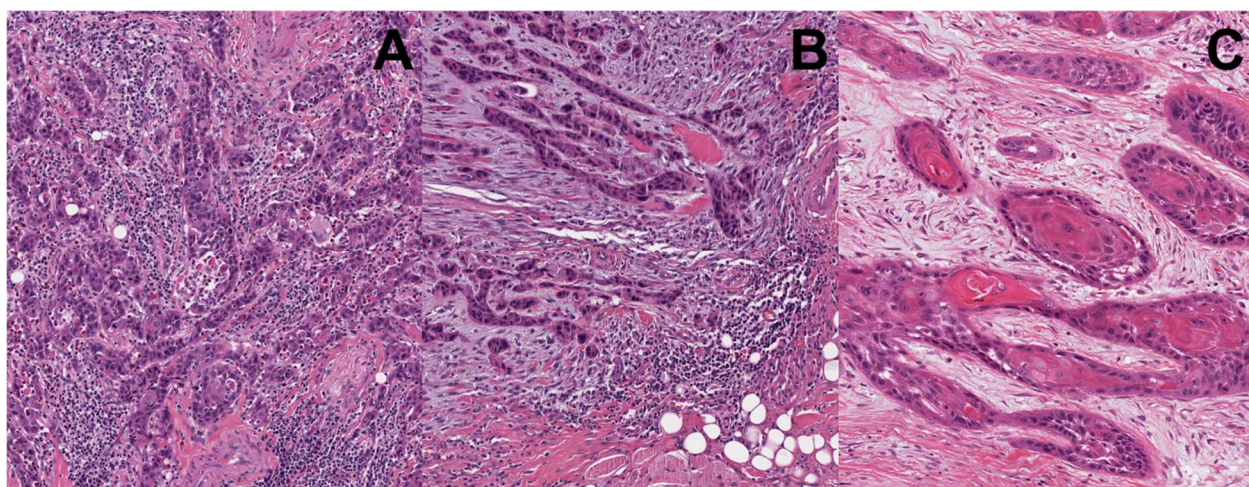


Figura 15. Rappresentazione istologica dell'immunofenotipo in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A) Immunofenotipo infiammatorio, in cui è presente un denso infiltrato linfocitario sia nell'epitelio neoplastico sia nello stroma tumorale; B) Immunofenotipo escluso, in cui l'infiltrato linfocitario è confinato allo stroma tumorale attorno alle isole di tessuto neoplastico; C) Immunofenotipo deserto, in cui il numero di linfociti a livello stromale e tumorale è trascurabile.

- Invasione Perineurale secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC): la presenza di cellule tumorali all'interno di uno dei tre strati della guaina nervosa o in stretta prossimità di un nervo, coinvolto per almeno il 33% della sua circonferenza, è stata valutata a basso ingrandimento ($\times 4$) e classificata in: intratumorale (all'interno della massa tumorale) ed extratumorale (nello stroma al di fuori delle isole neoplastiche); focale (coinvolgimento di un singolo ramo nervoso in qualsiasi parte del campione) e multifocale (coinvolgimento di ≥ 2 rami nervosi in qualsiasi parte del campione) [59] (Figura 16);

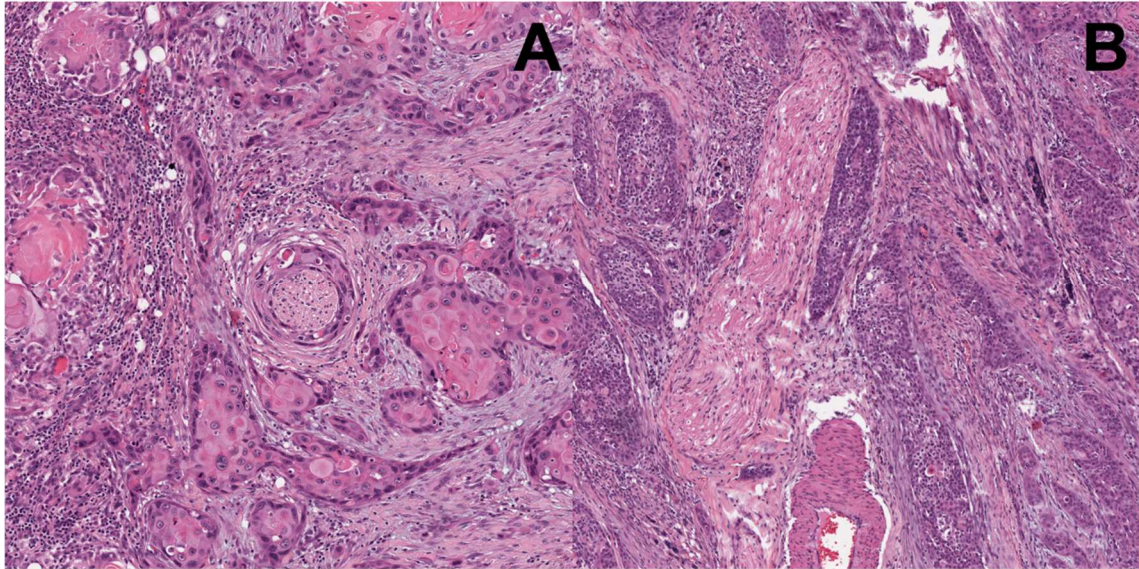


Figura 16. Rappresentazione istologica dell'invasione perineurale in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina. A) Fibra nervosa completamente invasa da cellule tumorali; B) Cellule tumorali in stretto contatto con un nervo, coinvolto per meno del 33% della sua circonferenza.

- Invasione Linfovaskolare secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC): la presenza di cellule o aggregati di cellule tumorali nella parete o nel lume di spazi (canali linfatici e/o sanguigni) rivestiti da endotelio è stata valutata a basso ingrandimento ($\times 4$) e classificata in maniera dicotomica in presente od assente [59] (Figura 17);

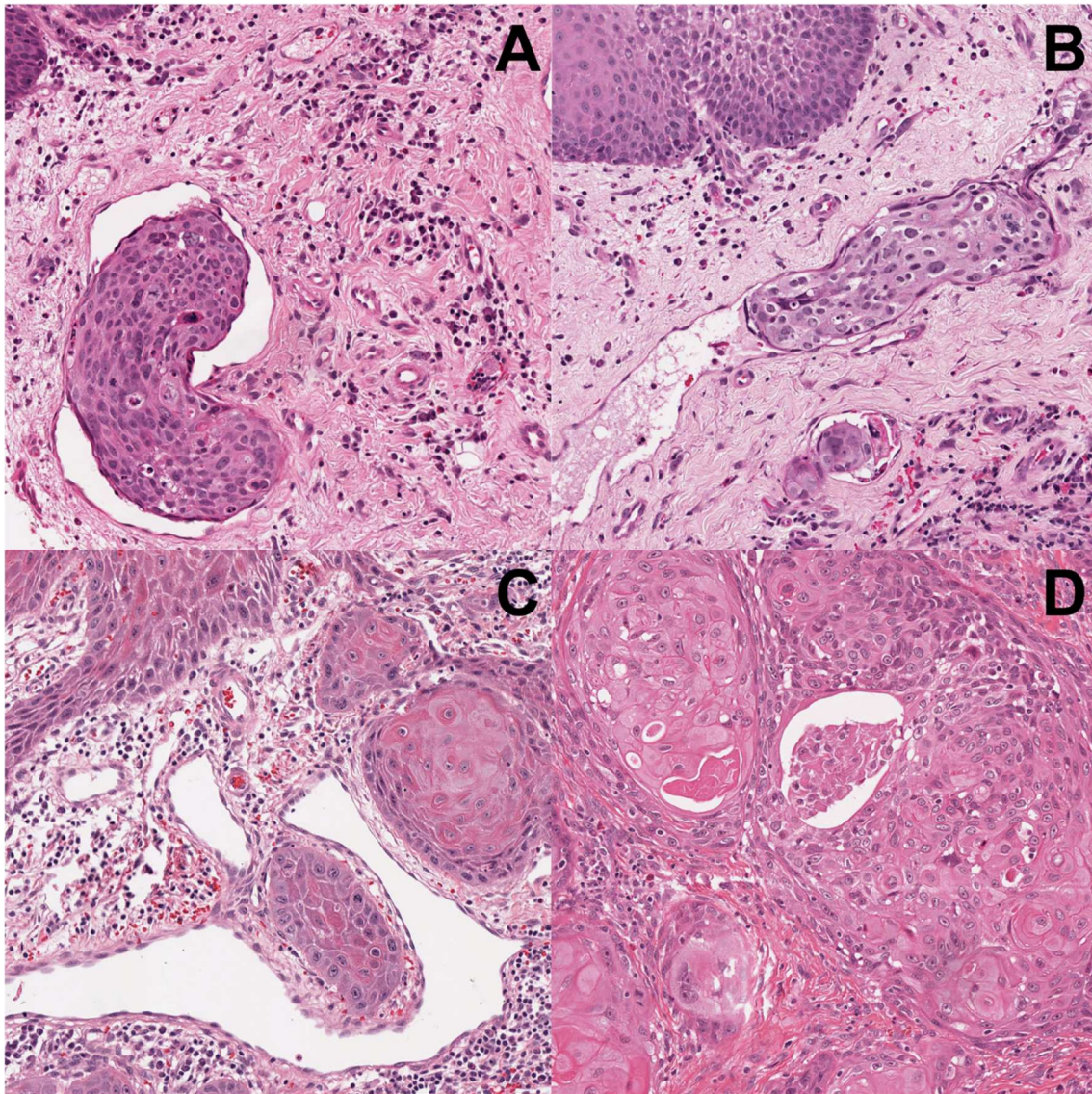


Figura 17. Raffigurazione istologica dell'invasione linfovaskolare in campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina: A, B) Piccoli cluster di cellule tumorali sono localizzati all'interno di uno spazio vascolare; C) Cellule tumorali in vicinanza di un vaso senza che questo venga raggiunto; D) Artefatti da retrazione del tessuto tumorale.

- Extranodal Extension secondo l'8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC): è stata valutata la presenza di estensione extranodale del tumore metastatico attraverso la capsula linfonodale macroscopicamente visibile o un'estensione microscopica > 2 mm (ENE ma) e classificata come presente o assente [59] (Figura 18).

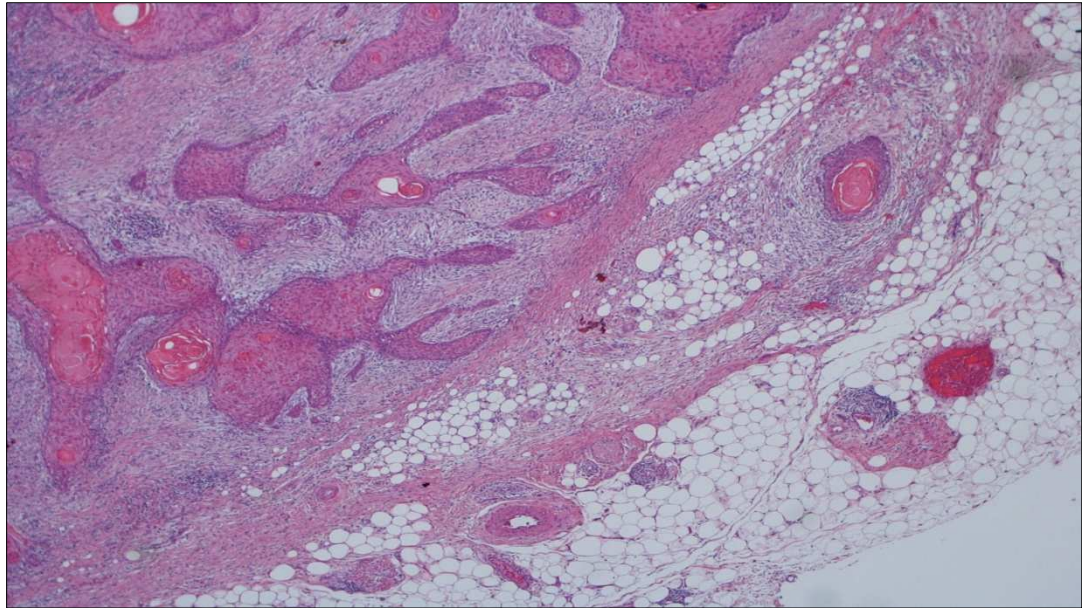


Figura 18. Rappresentazione istologica dell'estensione extranodale microscopica del tumore metastatico superiore a 2 mm (ENE (ma)) in un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezione istologica colorata con ematossilina-eosina.

5.3. SELEZIONE DEI CAMPIONI CHIRURGICI PER L'ANALISI DI MICROTOMOGRAFIA A LUCE DI SINCROTRONE

Dal pool dei casi inclusi nell'analisi istopatologica è stato selezionato casualmente un sottogruppo di 40 pazienti, equamente distribuiti per stadio patologico, da sottoporre ad analisi di microtomografia a raggi X, a contrasto di fase, ad alta risoluzione (XRPCT). Per ogni caso è stato selezionato il blocco fissato in formalina, incluso in paraffina comprendente la parte più invasiva del tumore primario, da cui è stata ricavata una sezione cilindrica di diametro inferiore a 2 mm, mediante punch per biopsia osteomidollare. In particolare, il campione è stato ricavato nell'area contenente la maggior percentuale di stroma in cui il campo d'immagine fosse completamente circondato da isole epiteliali neoplastiche, individuata mediante rivalutazione della sezione istologica colorata con ematossilina-eosina.

5.4. PRINCIPI FISICI DELLA MICROTOMOGRAFIA AD ALTA RISOLUZIONE A CONTRASTO DI FASE

La radiazione o luce di sincrotrone (SR) è la radiazione generata da una particella carica, tipicamente un elettrone, che viaggia a velocità relativistica, ovvero vicina a quella della luce, che soggetta ad un campo magnetico è in grado di modificare la sua traiettoria.

La SR non presenta una lunghezza d'onda unica, ma questa è distribuita su di un ampio spettro continuo di onde elettromagnetiche, variabili dall'infrarosso ai raggi X duri [175]. L'intensità della radiazione emessa e la sua distribuzione spettrale dipendono dai parametri costruttivi del magnete, quali l'intensità del campo magnetico ed il raggio di curvatura del magnete, e dall'energia degli elettroni. Le caratteristiche principali della SR sono: a) elevata intensità, che raggiunge ordini di grandezza tre/quattro volte superiori a quelli dei raggi X convenzionali e permette di ottenere un miglior rapporto segnale/rumore, una maggior risoluzione dei dati e tempi di acquisizione minori; b) emissione a bassa divergenza (collimazione) che consente di analizzare anche cristalli di piccole dimensioni; c) spettro continuo per poter variare la lunghezza d'onda della radiazione incidente in base al campo di applicazione; d) emissione pulsata poiché nel sincrotrone gli elettroni viaggiano in 'pacchetti' temporalmente e spazialmente separati chiamati "bunch"; e) polarizzazione lineare ben definita sul piano dell'orbita (piano ortogonale al vettore campo magnetico); f) elevata brillantezza, ovvero elevata quantità di fotoni emessi dalla sorgente ad una certa lunghezza d'onda, ma normalizzati per le dimensioni e per la divergenza del fascio di elettroni; h) elevata stabilità del fascio [176].

La SR è generata da acceleratori dotati di strutture magnetiche ottimizzate per massimizzare la produzione di radiazioni e successivamente trasportata alle stazioni sperimentali attraverso le cosiddette beamlines. Tali stazioni sono generalmente poste ad elevata distanza dalla sorgente e sono progettate per gestire esperimenti specifici a seconda dei campioni in studio, tenendo conto del flusso di fotoni, dell'intervallo di energia, della messa a fuoco e della collimazione dei raggi X. Le beamlines del SR sono caratterizzate da un elevato livello di coerenza spaziale, rendendo trascurabili la dispersione delle immagini e gli artefatti di beam hardening. Inoltre, garantiscono un basso ingrandimento dell'oggetto sul rivelatore [175].

In un sincrotrone, gli elettroni percorrono un'orbita chiusa (circolare o quasi) ed il raggio dell'anello (booster ring) è collegato all'energia degli elettroni in movimento; pertanto, più è elevata la loro energia, più il raggio dell'anello sarà grande. Gli elettroni si muovono in pacchetti (bunch) con una velocità prossima a quella della luce, possiedono un'energia dell'ordine dei gigaelettronvolt (variabile da 2,5 a 6 GeV) ed una corrente che nei sincrotroni moderni raggiunge i 150-500 milli-Ampere (mA). L'energia di un sincrotrone, cioè l'energia trasportata dai suoi elettroni, determina lo spettro di emissione del sincrotrone stesso: maggiore è l'energia più lo spettro di emissione è spostato verso radiazioni di lunghezza d'onda corta. Inoltre, più è elevata la corrente dell'anello, più intenso è il fascio di raggi X prodotto e più piccole sono la dimensione dei pacchetti (decine di μm) e la divergenza, più sarà piccolo il fascio di raggi X emesso.

Un moderno sincrotrone è un anello di accumulazione che si compone di: a) Electron-gun/linac, che produce, accelera e organizza gli elettroni in pacchetti; b) Booster, dove gli elettroni vengono trasferiti e ulteriormente accelerati fino alla loro energia finale; c) Anello di accumulazione, dove gli elettroni vengono immessi e fatti circolare indefinitamente. Ad ogni cambio di traiettoria operata dai magneti curvanti (bending magnets), dipoli che curvano il fascio di elettroni e li mantengono in un'orbita chiusa, gli elettroni perdono massa e vengono emessi dei raggi X incanalati nelle beamlines dove la radiazione acquisisce una determinata lunghezza d'onda. Inoltre, sono presenti degli elementi elettromagnetici (quadrupoli e sestupoli) che mantengono inalterata la dimensione e la divergenza del fascio di elettroni nell'anello di accumulazione [177] (Figura 19).

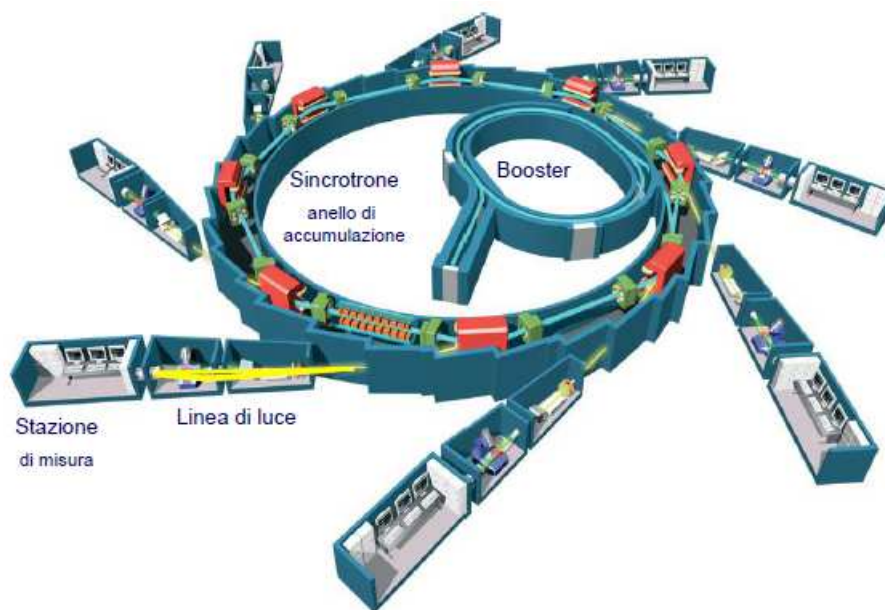


Figura 19. Composizione esemplificata di un Sincrotrone.

La microtomografia a SR si basa sulle proprietà di attenuazione dei tessuti di un campione, che dipendono dalle proprietà ottiche dell'oggetto stesso, che possono essere descritte dalla seguente relazione:

$$n = 1 - \delta + i \beta$$

dove δ è il decremento dell'indice di rifrazione responsabile dello sfasamento dell'onda di raggi X che si propaga attraverso l'oggetto e β è il coefficiente di estinzione correlato all'attenuazione dei raggi X nel campione [178].

Data la coerenza della SR, è possibile sfruttare il termine di sfasamento δ che è correlato alla densità elettronica dei tessuti all'interno del campione. Pertanto, quando tessuti differenti di uno stesso campione hanno densità elettronica simile o assorbimento dei raggi X trascurabile, l'impiego della SR produce notevoli vantaggi. Infatti, in questi casi, con la ricostruzione della distribuzione δ ,

il contrasto, la segmentazione e l'analisi quantitativa dell'immagine risultano notevolmente migliorati [175].

Rispetto alla radiografia convenzionale, basata sul contrasto di assorbimento, ovvero sulla parte immaginaria dell'indice di rifrazione, l'XRPC sfrutta la parte reale dell'indice di rifrazione complesso e per la formazione dell'immagine utilizza raggi X duri ad alta penetrazione con energie pari a $E \sim 10-100$ keV, che disponendo di un basso indice di attenuazione, riducono la dose assorbita ed il potenziale danno tissutale [179].

La XRPC supera i limiti dell'imaging a raggi X convenzionale, raggiungendo una risoluzione spaziale fino a $0,3 \mu\text{m}$, ovvero circa tre ordini di grandezza inferiori, ed un rapporto segnale-rumore, una profondità di penetrazione, una risoluzione spaziale ed un contrasto più elevati in tempi di acquisizione più brevi, anche rispetto all'imaging tomografico computerizzato 3D standard. Inoltre, la sorgente di raggi X è sintonizzabile, consentendo misurazioni ad energie differenti, la radiazione è monocromatica, così da eliminare gli effetti di beam hardening, e l'acquisizione a fasci paralleli permette l'impiego di algoritmi di ricostruzione tomografica esatti. Queste proprietà consentono la visualizzazione tridimensionale simultanea sia di tessuti molli che duri su di un'ampia scala di lunghezza, da millimetri a centinaia di nanometri, senza l'utilizzo di mezzi di contrasto e senza preparazione distruttiva del campione [180].

5.5. ANALISI DI MICROTOMOGRFIA A LUCE DI SINCROTRONE

La scansione tomografica è stata eseguita presso il SYRMEP beamline del Sincrotrone di ELETTRA a Basovizza, Trieste, Italia. Esso rappresenta un impianto di radiazione a sincrotrone di terza generazione caratterizzato da un fascio di elettroni con energia media compresa fra 2 e 2,4 Giga Eletttronvolt (GeV), un anello di immagazzinamento della circonferenza di 259,2 metri, un'intensità di corrente variabile fra 170 e 300 Milliampere (mA) e un'emissione energetica pari a 7,0 nm rad. Le scansioni sono state effettuate mediante il "pink beam" fornito dall'impianto di sincrotrone, filtrato da una lastra di silicio spessa 0,5 mm, in grado di produrre un fascio di raggi X con un'energia media di 19 Kilo eV (keV). Il tempo di esposizione per proiezione è risultato a pari 0,2 secondi per un intervallo di esposizione totale di 180 secondi e la distanza campione-rilevatore è stata impostata a 100 mm, risultando in una dimensione pixel isotropica delle proiezioni pari a 890 nm. La ricostruzione tomografica è stata eseguita con il software open-source SYRMEP Tomo Project (STP), attraverso il metodo di Paganin per l'algoritmo di recupero di fase, al fine di ricostruire il decremento δ dell'indice di rifrazione n .

Il metodo di Paganin consente il recupero di fase assumendo una relazione lineare tra l'indice di assorbimento β e il decremento dell'indice di rifrazione δ che è accettabile se i campioni sono

omogenei e se le distanze di propagazione rientrano nel regime del campo vicino. Le geometrie di scansione adottate ed i tessuti connettivi studiati soddisfano tali condizioni; pertanto, il rapporto δ/β è stato impostato su 100.

L'acquisizione delle immagini tridimensionali e delle sequenze bidimensionali, longitudinali e trasversali, con livelli di grigio proporzionali alla distribuzione della densità fisica del tessuto, è stata eseguita mediante il software VG Studio MAX 1.2 (Volume Graphics, Heidelberg, Germania) e il software open source ImageJ (imagej.nih.gov/ij, accessibile dal 26 aprile 2021). Il conteggio del numero di box è stato eseguito settando le seguenti impostazioni: dimensione iniziale del box (pixel [px]): 48; dimensione più piccola del box (px): 6; fattore di scala del box: 1,2; traslazione della griglia: 0. L'analisi morfometrica completa è stata eseguita utilizzando FIJI, una distribuzione del Software ImageJ, specializzato nell'analisi delle immagini in biologia. Esso, mediante moderni approcci di ingegneria informatica, combina potenti librerie con un'ampia gamma di linguaggi di scripting per consentire la prototipazione rapida di algoritmi di elaborazione delle immagini. Inoltre, facilita la trasformazione di nuovi algoritmi in plug-in ImageJ, così da permetterne la condivisione attraverso un sistema di aggiornamento integrato.

I dati volumetrici di interesse (VOI) sono stati estrapolati, sia a livello dello stroma peritumorale, ovvero nel fronte infiltrativo in prossimità delle isole e/o cellule epiteliali neoplastiche infiltranti lo stroma circostante, sia a livello dello stroma intratumorale, ovvero nello stroma disperso fra le isole e/o cordoni neoplastici, che a livello dello stroma extratumorale, mediante il software ORS Dragonfly 2022.1, applicando l'algoritmo Frangi3D. L'algoritmo, grazie alla derivata parziale di secondo ordine delle strutture locali delle immagini, riesce ad evidenziare sia le strutture tubulari sia le strutture vascolari per distinguere le differenti direzioni delle strutture geometriche prese in considerazione. La valutazione morfometrica delle fibre di collagene è stata eseguita analizzando i seguenti indici strutturali: a) volume specifico di collagene (Vol%, espresso in percentuale), ovvero il rapporto fra il volume dei voxels di collagene e il volume totale, b) spessore medio delle fibre di collagene (T_b, T_h ; espresso in micrometri), ovvero il diametro medio della sfera più grande inscritta in ciascun fascio di fibre collagene e c) distanza media fra le fibre di collagene (T_b, S_p ; espresso in micrometri). Inoltre, dato che le fibre collagene variano il loro orientamento sia nell'asse longitudinale sia nell'asse trasversale, sono state estratte informazioni relative alla presenza di orientamenti/direzioni spaziali preferenziali delle fibre stesse. In particolare, sono stati calcolati: a) l'indice del grado di anisotropia (DA-MIL) che quantifica l'orientamento di una struttura nello spazio, variabile fra i valori 0 (il materiale è isotropo; pertanto, le sue proprietà non dipendono dalla direzione analizzata ed ogni osservazione è confinata ad un singolo piano od asse) e 1 (il materiale è anisotropo; pertanto, le sue proprietà hanno caratteristiche che dipendono dalla direzione lungo la

quale vengono considerate); b) densità connettivale (Conn,D, espressa in micrometri³) che definisce l'interconnessione delle fibre collagene fra loro e produce valori più bassi per fibre scarsamente connesse; c) dimensione frattale (Fr.Dim) che descrive statisticamente in che modo un oggetto riempie lo spazio in cui è contenuto, ovvero quanto completo appare un frattale per riempire uno spazio, per studiare la forma e la struttura tridimensionale delle fibre collagene.

5.6. OUTCOME CLINICI

Gli outcome clinici sono rappresentati dalla sopravvivenza specifica di malattia (DSS), dalla sopravvivenza libera da malattia (DFS), e dalla sopravvivenza globale (OS). Il tempo di follow-up è stato stabilito calcolando il periodo di tempo intercorso dalla data dell'intervento chirurgico alla recidiva di malattia, per la DFS, alla data di decesso per cancro, per la DSS, o alla data dell'ultimo follow-up. Un periodo di tempo massimo di 120 mesi è stato considerato per il follow-up.

5.7. ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state condotte mediante il software SPSS versione 21.0 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA) ed il software STATA versione 16.0 (StataCorp LLC, 4905 Lakeway Drive College Station, Texas USA). I test di Shapiro-Wilk e di Kolgomorov-Smirnoff sono stati eseguiti per calcolare la normalità della distribuzione delle variabili. L'indice di correlazione R per ranghi di Spearman è stato misurato per valutare la presenza di correlazioni significative tra le caratteristiche clinico-patologiche considerate. I test non parametrici di Mann-Whitney e Kruskal-Wallis hanno analizzato le differenze delle variabili continue nei differenti gruppi clinico-patologici. Il test ANOVA a misure ripetute ha analizzato le differenze dei valori ottenuti da gruppi non indipendenti. Il test del Chi-quadrato è stato impiegato per analizzare le differenze tra variabili qualitative. Per stimare i tassi di sopravvivenza è stato utilizzato lo stimatore Kaplan-Meier, confrontando i risultati ottenuti mediante il test dei ranghi logaritmici (*log-rank test*) e costruendo le curve di sopravvivenza. L'analisi di regressione univariata di Cox è stata eseguita per studiare le associazioni fra le variabili e gli outcome clinici. Successivamente, per indagare il ruolo prognostico delle differenti variabili predittive, sono stati costruiti dei modelli multivariati di Cox. L'assunto del rischio proporzionale è stato controllato mediante un test della pendenza della regressione (*regression slope test*) in una regressione lineare generalizzata dei residui di Schoenfeld (comando *estat* su STATA). I modelli multivariati sono stati costruiti impiegando la regressione di tipo *stepwise*, un metodo statistico utilizzato per adattare i modelli di regressione in presenza di

molteplici variabili predittive, al fine di selezionare un sottoinsieme ottimale per la costruzione del modello il più efficiente possibile. In particolare, è stato adottato l'approccio di "*stepwise regression analysis*", in cui le variabili predittive vengono incluse ed escluse in base al loro valore predittivo, ovvero in base alla forza della correlazione con la variabile dipendente.

Infine, la performance dei modelli multivariati è stata valutata mediante l'indice di concordanza di Harrell (*Harrell's c-index*), il test di verifica delle informazioni di Akaike (*Akaike's information criterion*, AIC) e il criterio di informazione Bayesiano (*Bayesian information criterion*, BIC). L'indice di concordanza di Harrell permette di valutare la validità delle previsioni nell'analisi dei dati di durata, mentre l'AIC misura la qualità della stima di un modello statistico. Esso considera sia la bontà di adattamento, sia la complessità del modello e permette di quantificare la quota di informazioni perse quando un dato modello è usato per descrivere la realtà. Infine, il BIC viene impiegato per selezionare il modello più performante fra una classe di modelli parametrici con un diverso numero di parametri. Per tutte le analisi condotte è stato considerato un valore di significatività statistica P (p-value) $< 0,05$.

5.8. ANALISI DEL RISCHIO

I casi sono stati selezionati dall'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche che include campioni tissutali di circa 1000 pazienti affetti da carcinoma orale, di cui circa 400 con diagnosi di carcinoma squamocellulare orale della lingua, garantendo un ampio margine di sicurezza per il raggiungimento di un'adeguata dimensione campionaria. In particolare, la dimensione del campione, calcolata per valutare DSS, OS e DFS, con un hazard ratio di 2 (livello di significatività bilaterale del 5% per il log-rank test e una potenza del 80%) ha stimato che il numero di pazienti richiesti era di 207 soggetti. La qualità dei campioni tissutali è stata valutata indipendentemente da due esperti patologi orali e ogni disaccordo è stato risolto mediante consenso fra di essi. Al fine di evitare il prelievo di aree danneggiate, per ogni campione chirurgico sottoposto a microtomografia a luce di sincrotrone sono state ricavate due sezioni cilindriche dell'area tumorale maggiormente invasiva con la più alta percentuale di stroma. I dati del SYRMEP beamline sono stati acquisiti durante un unico ciclo di lavoro della macchina, in modo da evitare che differenti cicli potessero influenzare i valori di alcuni parametri costitutivi del fascio di elettroni (ad esempio: energia dei fotoni, densità di distribuzione dei fotoni).

6. RISULTATI

6.1. CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEI CASI SOTTOPOSTI AD INDAGINE DI MICROSCOPIA OTTICA

6.1.1. Caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici

Lo studio ha incluso 211 campioni chirurgici relativi a pazienti affetti da carcinoma squamocellulare orale della lingua, di cui 135 maschi (64,0%) e 76 femmine (36,0%), con un rapporto maschi/femmine pari a 1,8:1. L'età media alla diagnosi è risultata di $64,7 \pm 13,8$ anni (range: 23-93 anni), superiore nel genere femminile ($68,1 \pm 12,9$ anni) rispetto a quello maschile ($62,8 \pm 13,9$ anni). Il diametro massimo dei tumori è pari a $2,5 \pm 1,3$ cm (range: 0,3-7,0 cm) ed i margini di resezione sono risultati positivi in 100 soggetti (47,4%). Tutti i pazienti sono stati testati per infezione da HPV e nessuno di essi è risultato positivo. Secondo il Grading istologico della 4° Edizione del WHO, 37 pazienti sono stati classificati come G1 (17,5%), 115 come G2 (54,2%) e 59 come G3 (27,7%). La valutazione del parametro pT secondo la 8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) ha classificato 61 casi come pT1 (28,9%), 100 casi come pT2 (47,4%), 41 casi come pT3 (19,4%) e 9 casi come pT4 (4,3%). Il 36,0% dei soggetti ha presentato un DOI a basso rischio ($\text{DOI} \leq 5$ mm), il 46,5% dei casi è risultato a rischio moderato ($5\text{mm} < \text{DOI} \leq 10$ mm), mentre nel 17,5% dei pazienti il DOI ha superato i 10 mm (DOI ad alto rischio). Riguardo al parametro pN, 132 casi sono risultati negativi per metastasi linfonodali (62,6%), 28 sono stati classificati come pN1 (13,3%), 47 casi come pN2 (22,3%) e 4 casi come pN3 (1,9%). La presenza di ENE(ma) è stata rilevata nel 10,4% dei casi (22 pazienti). Infine, metastasi a distanza sono state diagnosticate solamente in tre soggetti. Complessivamente, 40 pazienti sono stati classificati in Stadio I (19,0%), 60 in Stadio II (28,4%), 51 in Stadio III (24,2%) e 60 in Stadio IV (28,4%). La presenza di PNI è stata riscontrata in 83 pazienti e classificata come focale e multifocale rispettivamente nel 12,3% e nel 27,0% dei casi, mentre la presenza di LVI ha interessato esclusivamente 30 pazienti (14,2%). Per quanto riguarda il POI, la maggior parte dei tumori ha mostrato la presenza contemporanea di differenti pattern infiltrativi, in particolare: il POI-1 è risultato presente in 97 casi, il POI-2 in 110 casi, il POI-3 in 124 casi, il POI-4 in 77 casi ed il POI-5 in 10 casi. Per tutti i casi è stato possibile definire il WPOI, in particolare: un WPOI-1 è stato attribuito a 31 casi (14,7%), un WPOI-2 a 32 casi (15,2%), un WPOI-3 a 72 casi (34,1%), un WPOI-4 a 66 casi (31,3%) e infine un WPOI-5 ai restanti 10 casi (4,7%). Analogamente, è stato valutato il PPOI in tutti i casi considerati: 71 casi hanno mostrato un PPOI-1 (33,6%), 35 casi un

PPOI-2 (16,6%), 68 casi un PPOI-3 (32,2%) e 37 casi un PPOI-4 (17,5%), mentre il PPOI-5 non è stato riscontrato come pattern prevalente in nessun paziente. Il periodo di follow-up medio è stato stimato a $50,9 \pm 37,1$ mesi, variabile da 3 a 120 mesi. Le recidive locoregionali hanno coinvolto il 31,3% dei pazienti e sono insorte mediamente dopo $24,0 \pm 25,0$ mesi (range: 3-108 mesi) dal trattamento chirurgico iniziale. Il 45,0% dei soggetti è deceduto per malattia, dopo un intervallo di tempo medio di $31,8 \pm 25,9$ mesi (range: 3-116 mesi), mentre ulteriori 12 pazienti (5,7%) sono deceduti per cause diverse da OTSCC. Le principali caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici inclusi nell'analisi di microscopia ottica sono riportati in Tabella 2.

Parametro	n. (%)	Media \pm DS (range)
Età		$64,7 \pm 13,8$ (23 - 93)
Genere		
- <i>M</i>	135 (64)	
- <i>F</i>	76 (36)	
Dimensione (cm)		$2,5 \pm 1,3$ (0,3 - 7)
Margini		
- <i>Positivi</i>	100 (48,1)	
- <i>Negativi</i>	108 (51,9)	
Grading (4° Ed. WHO)		
- <i>G1</i>	37 (17,5)	
- <i>G2</i>	115 (54,5)	
- <i>G3</i>	59 (27,0)	
pT (8° Ed. AJCC)		
- <i>1</i>	61 (28,9)	
- <i>2</i>	100 (47,4)	
- <i>3</i>	41 (19,4)	
- <i>4</i>	9 (4,3)	
DOI		
- ≤ 5 mm	76 (36,0)	
- <i>5-10 mm</i>	98 (46,5)	
- >10 mm	37 (17,5)	
pN (8° Ed. AJCC)		
- <i>1</i>	132 (62,6)	
- <i>2</i>	28 (13,3)	
- <i>3</i>	47 (22,3)	
- <i>4</i>	4 (1,9)	
ENE (ma)		
- <i>Positivo</i>	22 (10,4)	
- <i>Negativo</i>	189 (89,6)	
Staging (8° Ed. AJCC)		
<i>I</i>	40 (19,0)	
<i>II</i>	60 (28,4)	
<i>III</i>	51 (24,2)	
<i>IV</i>	60 (28,4)	

PNI		
-	<i>Positivo</i>	83 (39,3)
	Focale	26 (12,3)
	Multifocale	57 (27,0)
	Intratumorale	64 (30,3)
	Peritumorale	45 (21,3)
-	<i>Negativo</i>	128 (60,7)
LVI		
-	<i>Positivo</i>	30 (14,2)
-	<i>Negativo</i>	181 (85,8)
POI		
-	1	97 (45,0)
-	2	110 (52,1)
-	3	124 (58,8)
-	4	77 (36,5)
-	5	10 (4,7)
WPOI		
-	1	31 (14,7)
-	2	32 (15,2)
-	3	72 (34,1)
-	4	66 (31,3)
-	5	10 (4,7)
PPOI		
-	1	71 (33,6)
-	2	35 (16,6)
-	3	68 (32,2)
-	4	37 (17,1)

Tabella 2. Principali caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua inclusi nell'analisi di microscopia ottica. (M: maschio; F: femmina; G: grading; PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; POI: pattern di invasione; PPOI: pattern di invasione prevalente; WPOI: pattern di invasione peggiore; DOI: profondità di invasione tumorale; ENE: estensione extranodale; DS: deviazione standard; Ed.: edizione; WHO: World Health Organization; AJCC: American Joint Committee on Cancer).

6.1.2. *Classificazione campioni chirurgici secondo i parametri morfologici dello stroma tumorale*

Il numero medio di TB è risultato pari a $4,5 \pm 5,0$, variabile da 0 a 26 buds per campo. Un basso valore di TB è stato osservato nel 45,5% (96 pazienti) e nel 66,8% dei casi (141 pazienti), classificati rispettivamente secondo il sistema TB2 ed i sistemi a punteggio TB1 e TB3. Un alto valore di TB è stato dimostrato nel 54,5% dei casi classificati secondo TB2, nel 33,2% dei casi secondo TB1, e nel 13,3% dei casi secondo TB3. In accordo con il BD Model, 48 (22,9%), 103 (48,8%) e 60 (28,4%) pazienti sono stati classificati rispettivamente come BD0, BD1 e BD2, mentre secondo il RG System, oltre la metà dei casi (51,2%) è risultato a rischio elevato, il 43,6% dei casi a

rischio intermedio e solamente il 5,2% dei casi a basso rischio (Tabella 3). La rappresentazione istologica microscopica del TB è mostrata in Figura 20.

Il valore del TSR è risultato ampiamente variabile dallo 0% al 80%, con valore medio di stroma tumorale pari al 25,0% \pm 22,0%. Classificando il TSR in maniera dicotomica, mediante un cut-off pari al 50%, 180 casi (85,3%) hanno registrato un valore di TSR alto, mentre 31 casi (14,7%) un valore di TSR basso (Tabella 3). La rappresentazione istologica microscopica del TSR è raffigurata in Figura 21. Analizzando il fenotipo tumorale, l'immuno-escluso è risultato il fenotipo predominante (109 casi), seguito dall' immuno-infiammato (77 casi) e dal fenotipo immuno-deserto (25 casi) (Tabella 3). La raffigurazione istologica microscopica dei tre differenti fenotipi tumorali è mostrata nelle Figure 22, 23 e 24.

Scoring system	n. (%)
TB1	
- < 5 buds/ \times 20	141 (66,8)
- \geq 5 buds/ \times 20	70 (33,2)
TB2	
- < 3 buds/ \times 20	96 (45,5)
- \geq 3 buds/ \times 20	115 (54,5)
TB3	
- 0-4 buds/ \times 20	141 (66,8)
- 5-9 buds/ \times 20	42 (19,9)
- \geq 10 buds/ \times 20	28 (13,3)
BD Model	
- <i>BD0</i>	48 (22,8)
- <i>BD1</i>	103 (48,8)
- <i>BD2</i>	60 (28,4)
Revised Grading	
- <i>RG1</i>	11 (5,2)
- <i>RG2</i>	92 (43,6)
- <i>RG3</i>	108 (51,2)
TSR	
- <i>Alto</i>	180 (85,3)
- <i>Basso</i>	31 (14,7)
Immunofenotipo	
- <i>Infiammato</i>	77 (36,5)
- <i>Escluso</i>	109 (51,7)
- <i>Deserto</i>	25 (11,8)

Tabella 3. Distribuzione dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua in base ai differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio applicati per il tumor budding, tumor stroma ratio ed immunofenotipo (TB: tumor budding; RG: Revised Grading; TSR: Tumor Stroma Ratio).

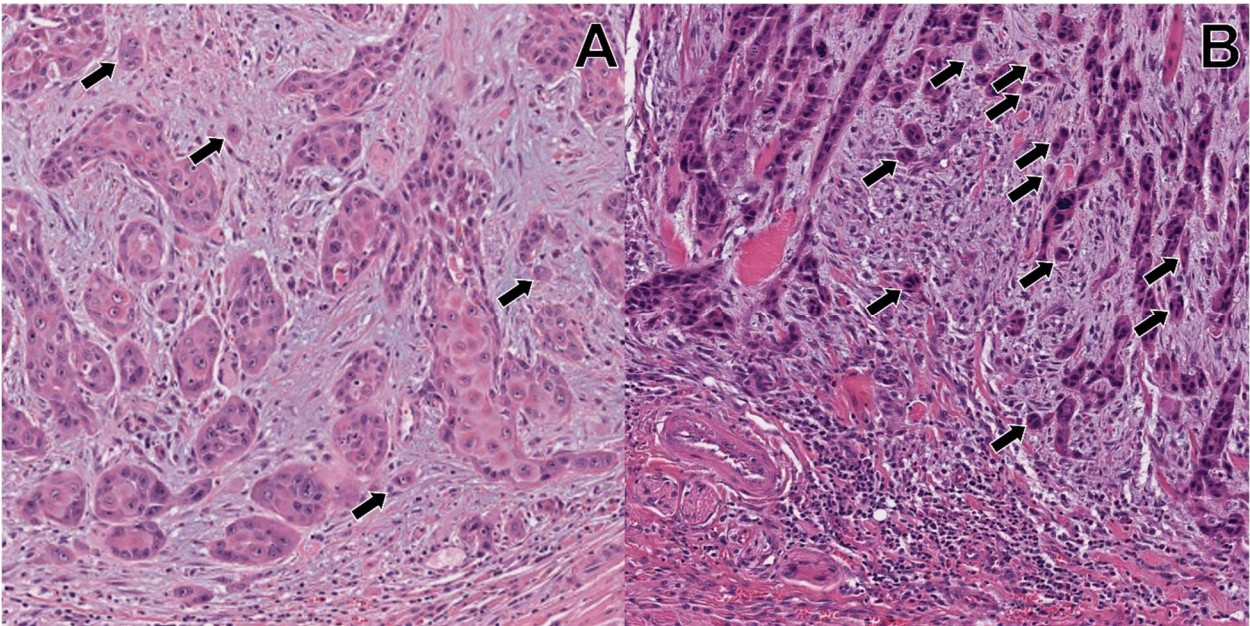


Figura 20. Valutazione del tumor budding sul fronte infiltrativo di carcinomi squamocellulari orali della lingua su sezioni colorate con ematossilina-eosina: A) Basso numero di buds tumorali (x200); B) Alto numero di buds tumorali (x200). Le frecce indicano i foci di budding tumorale.

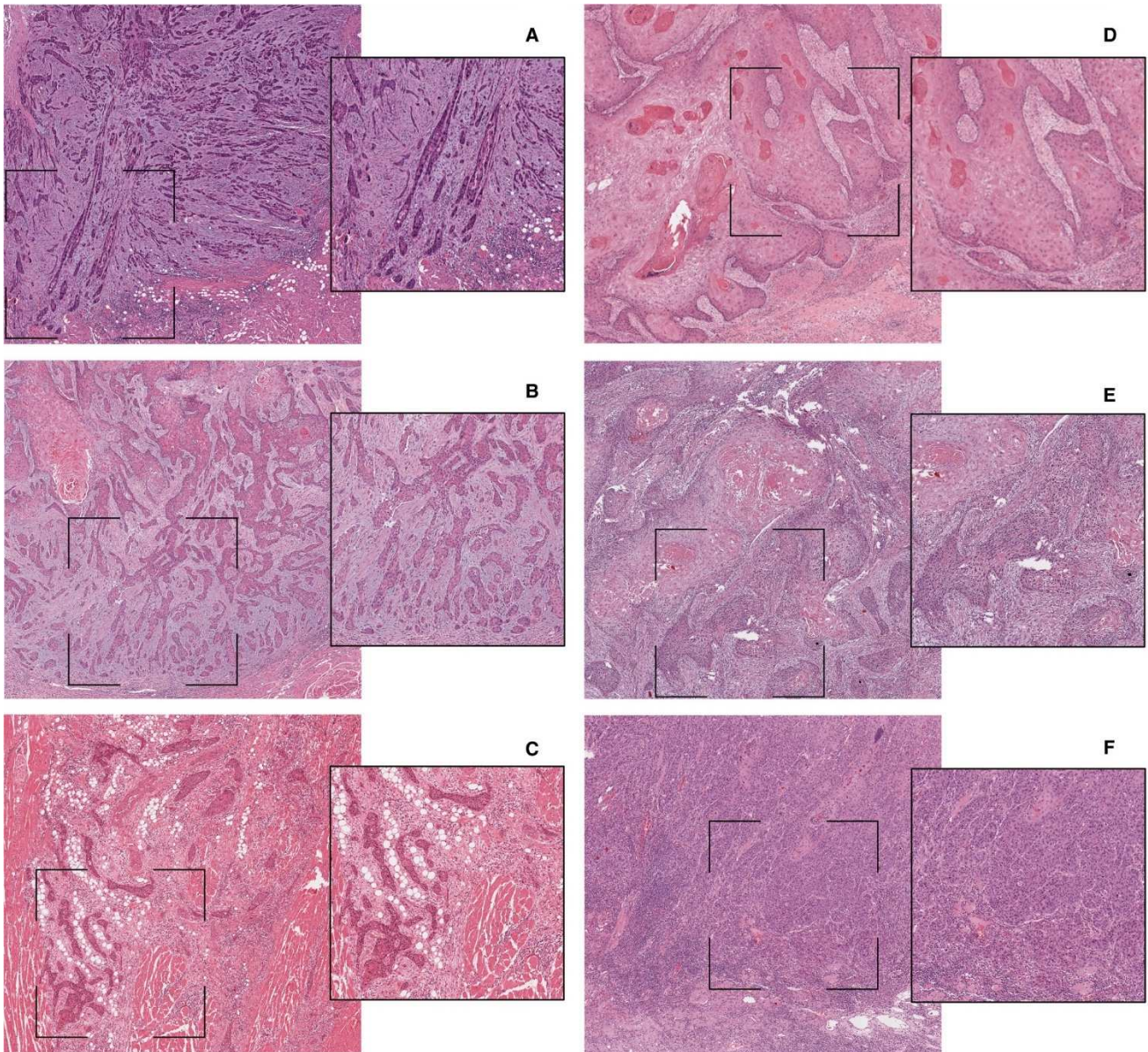


Figura 21. Valutazione del tumor stroma ratio sul fronte infiltrativo di campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua su sezioni colorate con ematossilina-eosina. A-C) Tre esempi di campioni con alta percentuale di stroma tumorale (TSR < 50%); D-F) Tre esempi di campioni con bassa percentuale di stroma tumorale (TSR ≥ 50%). Le aree selezionate raffigurano il Tumor Stroma Ratio valutato ad alto ingrandimento (x200).

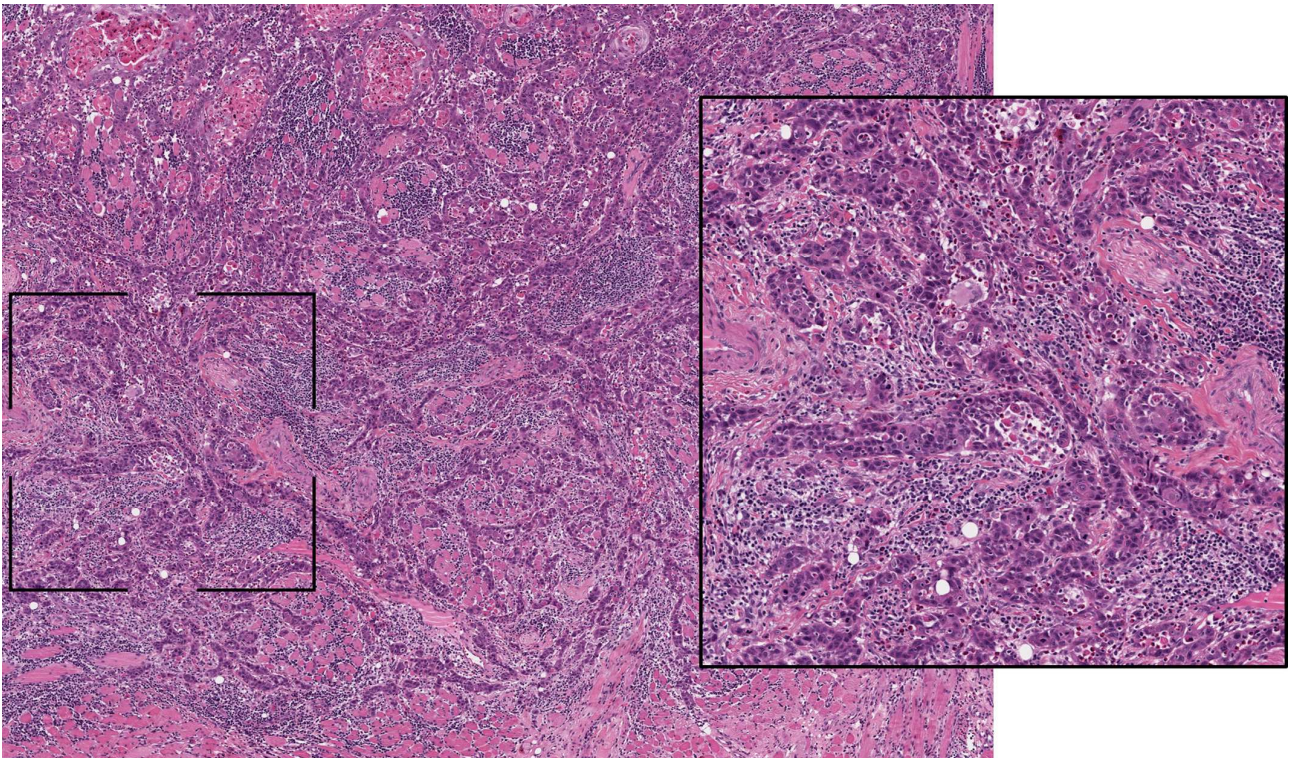


Figura 22. Rappresentazione istologica di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua con fenotipo immuno-infiammato su sezione colorata con ematossilina-eosina. L'area di alto ingrandimento (x200) mostra un denso infiltrato di cellule T sia nell'epitelio neoplastico sia nello stroma tumorale.

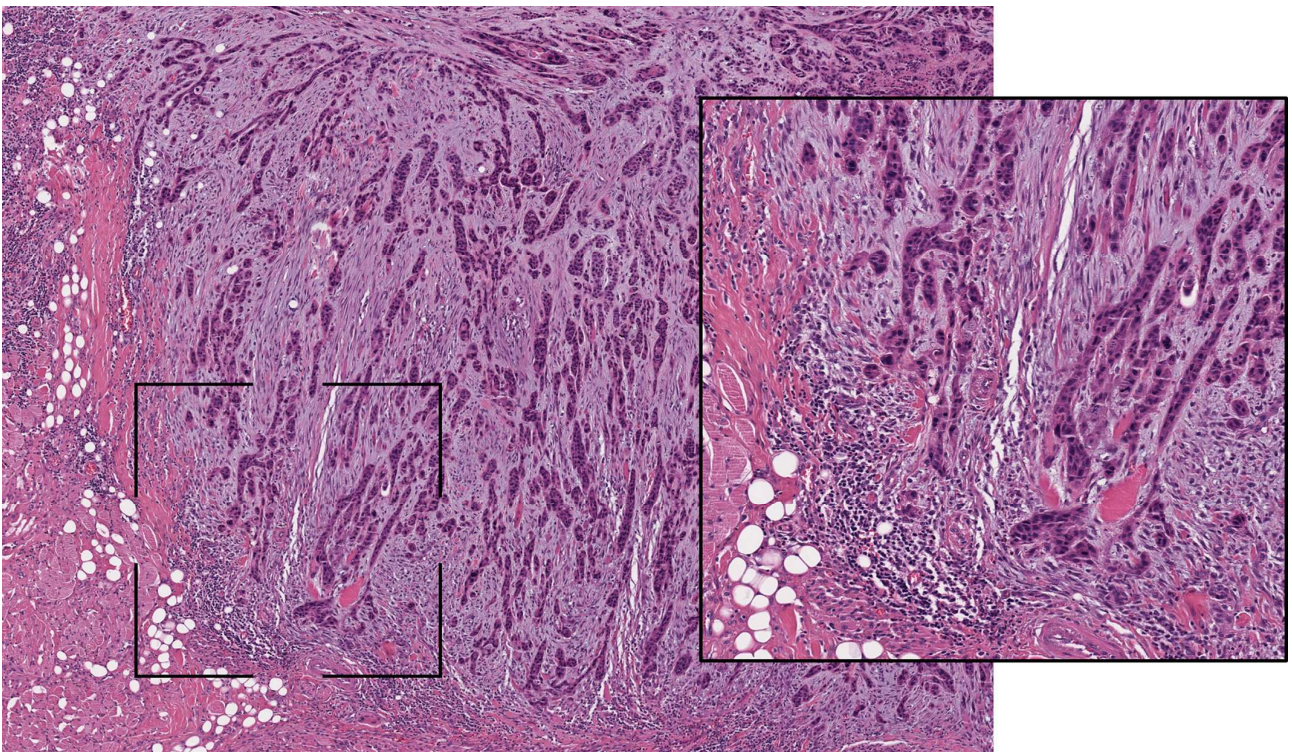


Figura 23. Rappresentazione istologica di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua con fenotipo immuno-escluso su sezione colorata con ematossilina-eosina. L'area ad alto ingrandimento (x200) mostra la presenza di un infiltrato di cellule T esclusivamente nello stroma tumorale attorno al bordo infiltrativo del tumore.

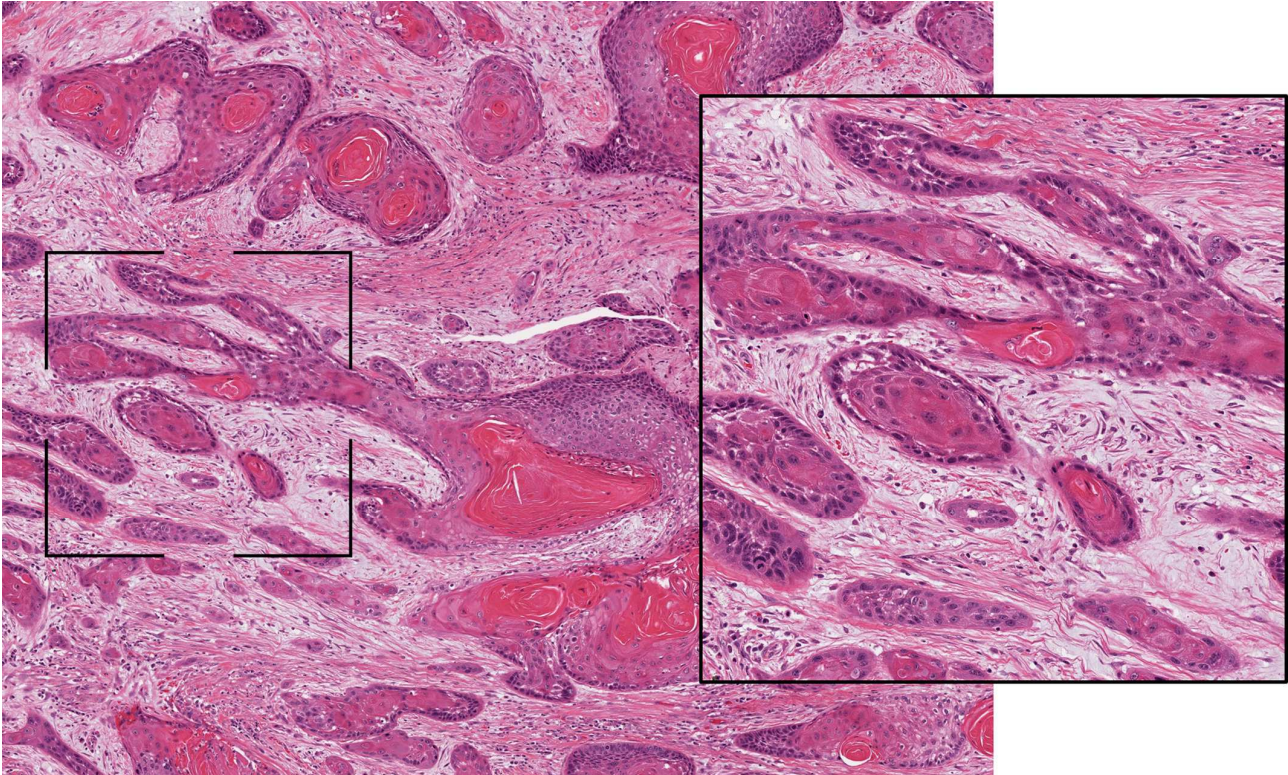


Figura 24. Rappresentazione istologica di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua con fenotipo immuno-deserto su sezione colorata con ematossilina-eosina. L'area ad alto ingrandimento (x200) mostra la presenza di un trascurabile infiltrato di cellule T sia nell'epitelio neoplastico, sia nello stroma tumorale.

6.2. ANALISI DI CORRELAZIONE E DI SOPRAVVIVENZA DELL'INDAGINE DI MICROSCOPIA OTTICA

6.2.1. *Tumor Budding*

Dall'analisi di correlazione R per ranghi di Spearman emerge come il numero di buds sia correlato alle dimensioni tumorali ($\rho=0,148$; $P=0,035$), al grado di differenziazione ($\rho=0,179$; $P=0,009$), allo stadio di malattia ($\rho=0,276$; $P<0,001$), al DOI ($\rho=0,175$; $P=0,011$) ed al WPOI ($\rho=0,519$; $P<0,001$) (Tabella 4). In particolare, tumori scarsamente differenziati, in stadio avanzato di malattia e con PNI multifocale hanno mostrato valori medi di TB significativamente superiori rispetto a tumori ben differenziati ($P=0,0033$; $G3=5,86 \pm 5,76$ vs $G1=3,59 \pm 4,64$), in stadio iniziale ($P<0,001$; Stadio IV= $5,25 \pm 4,98$ vs Stadio I= $2,65 \pm 4,52$) e senza coinvolgimento perineurale ($P<0,001$; PNI multifocale= $7,07 \pm 5,52$ vs PNI negativo = $3,41 \pm 4,50$). Al contrario, il numero medio TB non differisce significativamente fra pazienti di genere maschile e femminile ($P=0,338$), casi con o senza coinvolgimento linfovascolare ($P=0,104$), metastasi linfonodali ($P=0,090$), ed ENE (ma) ($P=0,105$).

Variabile	Età	Dimensione	n. buds	Grading	RG System	TB1	TB2	TB3	BD Model	WPOI	pT	Stadio	DOI
Età	$\rho = 1$	0,110	-0,104	-0,222	-0,215	-0,101	-0,041	-0,100	-0,101	-0,136	-0,025	-0,046	-0,048
	P-value=1	0,877	0,131	0,001	0,002	0,144	0,556	0,149	0,144	0,048	0,720	0,503	0,490
Dimensione	$\rho = 1$		0,148	0,135	0,258	0,123	0,130	0,117	0,376	0,081	0,696	0,505	0,543
	p-value=1		0,035	0,054	<0,001	0,079	0,065	0,096	<0,001	0,247	<0,001	<0,001	<0,001
n. di buds	$\rho = 1$			0,179	0,636	0,823	0,870	0,839	0,696	0,519	0,215	0,276	0,175
	P-value=1			0,009	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	0,011
Grading	$\rho = 1$				0,600	0,130	0,088	0,142	0,109	0,063	0,109	0,250	0,050
	p-value=1				<0,001	0,059	0,200	0,040	0,113	0,361	0,116	<0,001	0,466
RG System	$\rho = 1$					0,673	0,498	0,660	0,564	0,274	0,252	0,334	0,154
	p-value=1					<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,025
TB1	$\rho = 1$						0,644	0,981	0,802	0,371	0,178	0,178	0,128
	p-value=1						<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,010	0,010	0,063
TB2	$\rho = 1$							0,631	0,597	0,410	0,220	0,274	0,201
	p-value=1							<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,003
TB3	$\rho = 1$								0,777	0,402	0,166	0,171	0,121
	p-value=1								<0,001	<0,001	0,016	0,013	0,079
BD Model	$\rho = 1$									0,372	0,472	0,340	0,539
	p-value=1									<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

WPOI	$\rho = 1$	0.131	0,192	0,230
	p-value=1	0.057	0,005	0,001
pT	$\rho = 1$		0,497	0,752
	p-value=1		<0,001	<0,001
Stadio	$\rho = 1$			0,447
	p-value=1			0,001
DOI				$\rho = 1$
				p-value=1

Tabella 4. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra i differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio del tumor budding ed i dati clinico-patologici dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare della lingua inclusi nell' analisi microscopica (TB: tumor budding; RG: Revised Grading; DOI: profondità di invasione; WPOI: pattern di invasione peggiore).

Come variabile continua, il TB risulta significativamente associato a DSS, sia all'analisi univariata (HR= 1,07; 95% CI 1,04-1,11; P<0,0005), sia all'analisi multivariata (HR= 1,07; 95% CI 1,03-1,11; P<0,0005). I dati dell'analisi univariata hanno dimostrato come, applicando un cut-off pari a 5 buds/campo (TB1), i pazienti ad alto rischio hanno una probabilità doppia di decesso per malattia, rispetto ai pazienti a basso rischio (HR= 2,37; 95% CI 1,57-3,56; P<0,0005); così come i pazienti a rischio intermedio (HR= 2,01; 95% CI 1,28-3,34; P=0,003) ed alto (HR= 2,97; 95% CI 1,73-5,10; P<0,0005) del sistema di classificazione ITBCC, ed i pazienti ad alto rischio (BD2) secondo BD Model (HR= 2,20; 95% CI 1,25-3,82; P=0,006) (Tabella 5). Applicando il sistema di punteggio TB3 non emergono differenze significative fra i gruppi Bd0 e Bd1 e secondo il BD Model solamente l'associazione di entrambi i fattori di rischio avversi (BD2) sembrerebbe peggiorare significativamente la DSS dei soggetti con OTSCC. Pertanto, la stratificazione potrebbe essere semplificata a due gruppi di rischio. Al contrario, lo score TB2 ed il modello RG System non sono stati in grado di predire la DSS dei pazienti affetti da OTSCC, né all'analisi univariata (TB2: HR= 1,38; 95% CI 0,92-2,08; P=0,124; RG System: HR= 2,77; 95% CI 0,87-8,82; P=0,124), né all'analisi multivariata (TB2: HR= 1,03; 95% CI 0,66-1,60; P =0,888; RG System: HR= 2,03; 95% CI 0,58-7,09; P=0,266) (Tabelle 5 e 6).

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.	AIC	BIC	c-index
TB	1,0726	0,0175	4,28	0,000	1,0387-1,1076	905,9677	909,3195	0,614
TB1	2,3668	0,4920	4,14	0,000	1,5747-3,5574	904,3063	907,6581	0,606
TB2	1,3782	0,2877	1,54	0,124	0,9154-2,0750	918,1913	921,5431	0,545
TB3								
- Bd1	2,0661	0,5058	2,96	0,003	1,2786-3,3385	904,968	911,6717	0,616
- Bd2	2,9704	0,8184	3,95	0,000	1,7309-5,0975			
BD Model								
- BD1	1,0522	0,2921	0,18	0,855	0,6106-1,8131	911,3839	918,0876	0,593
- BD2	2,1821	0,6244	2,73	0,006	1,2453-3,8236			
RG System								
- RG2	0,9470	0,5783	-0,09	0,929	0,2861-3,1344	897,4352	904,1389	0,615
- RG3	2,7704	1,6374	1,72	0,085	0,8698-8,8237			

Tabella 5. Analisi univariata dei differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio del tumor budding per la sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (TB: tumor budding; RG: Revised Grading; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; AIC: Akaike information criterion; BIC: Bayesian information criterion, c-index: Harrel's c-index).

I risultati dell'analisi multivariata riguardanti l'effetto predittivo del TB sulla DSS sono riportati in Tabella 6. I dati confermano il valore predittivo del TB, sia come variabile continua, sia applicando il cut-off di 5 buds / campo (HR= 2,21; 95% CI 1,42-3,46; P<0,0005), sia classificando i pazienti in tre categorie di rischio secondo TB3. In particolare, il rischio più elevato è stato registrato nel gruppo Bd2, in cui la probabilità di decesso per malattia è risultata 3 volte superiore rispetto al gruppo Bd0 (HR= 3,10; 95% CI 1,73-5,48; P<0,0005).

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.	AIC	BIC	c-index
TB	1,0700	0,0201	3,59	0,000	1,0312-1,1103	876,106	906,2727	0,728
TB1	2,2142	0,5037	3,49	0,000	1,4176-3,4585	875,1459	905,3126	0,735
TB2	1,0321	0,2321	0,14	0,888	0,6642-1,6039	886,8702	917,0370	0,715
TB3								
- Bd1	1,8318	0,4820	2,30	0,021	1,0936-3,0683	874,5748	908,0933	0,739
- Bd2	3,0829	0,9047	3,84	0,000	1,7344-5,4797			
BD model								
- BD1	0,4977	0,1629	-2,13	0,033	0,2620-0,9455	874,6608	908,1794	0,735
- BD2	1,2446	0,4478	0,91	0,543	0,6148-2,5194			
RG System								
- RG2	0,8614	0,5463	-0,24	0,814	0,2485-2,9856	875,942	909,4606	0,734
- RG3	2,0320	1,2960	1,11	0,266	0,5821-7,0933			

Tabella 6. Analisi multivariata dei differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio del tumor budding per la sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni. (TB: tumor budding; RG: Revised Grading; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; AIC: Akaike information criterion; BIC: Bayesian information criterion, c-index: Harrel's c-index).

Tali risultati sono stati confermati anche includendo il TB nei modelli multivariati di Cox unitamente agli ulteriori fattori predittivi di scarsa DSS (stadio patologico, età, genere, PNI, LVI) ed applicando il test post-hoc di correzione di Bonferroni (Tabella 7, 8 e 9). L'età è stata inclusa come variabile continua; genere, stadio patologico, PNI ed LVI come variabili categoriali; mentre il TB è stato considerato sia come variabile continua, sia come variabile categoriale. In particolare, la PNI è stata classificata come "0" se negativa, "1" se focale e "2" se multifocale.

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)					
- II vs I	1,8632	0,7408	1,57	0,118	0,8546-4,0620
- III vs I	1,4640	0,6169	0,90	0,366	0,6409-3,3440
- IV vs I	3,5416	1,3405	3,34	0,001	1,6866-7,4367
Genere					
- M	1,573731	0,3922	1,82	0,069	0,9655-2,5651
Età	1,0281	0,0090	3,14	0,002	1,0104-1,0461
PNI					
- 1 vs 0	1,7291	0,5600	1,69	0,091	0,9164-3,2623
- 2 vs 0	1,6608	0,4294	1,96	0,050	1,0005-2,7568
LVI	1,5826	0,4394	1,65	0,098	0,9184-2,7273
TB	1,0700	0,0201	3,59	0,000	1,0312-1,1103

Tabella 7. Modello multivariato di Cox che include il tumor budding come variabile continua e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; TB: tumor budding; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza).

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)					
- II vs I	1,6686	0,6692	1,28	0,202	0,7602-3,6624
- III vs I	1,5203	0,6389	1,00	0,319	0,6671-3,4649
- IV vs I	3,5478	1,3499	3,33	0,001	1,6830-7,4798
Genere					
- M	1,6168	0,4054	1,92	0,055	0,9890-2,6433
Età	1,0296	0,0088	3,41	0,001	1,0125-1,0470
PNI					0,8595-3,0350
- 1 vs 0	1,6151	0,5198	1,49	0,136	0,8186-2,3780
- 2 vs 0	1,3952	0,3795	1,22	0,221	
LVI	1,5870	0,4422	1,66	0,097	0,9191-2,7403
TB1	2,2142	0,5037	3,49	0,000	1,4176-3,4585

Tabella 8. Modello multivariato di Cox che include il tumor budding categorizzato secondo il sistema di punteggio proposto da Wang C., et al., e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; TB: tumor budding; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza).

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
Stadio					
- II vs I	1,7789	0,7166	1,43	0,153	0,8077-3,9178
- III vs I	1,4855	0,6278	0,94	0,349	0,6488-3,4013
- IV vs I	3,7206	1,4179	3,45	0,001	1,7628-7,8527
Genere	1,6458	0,4144	1,98	0,048	1,0046-2,6962
- M					
Età	1,0295	0,0090	3,32	0,001	1,0120-1,0445
PNI					
- 1 vs 0	1,6584	0,5349	1,57	0,117	0,8813-3,1208
- 2 vs 0	1,4431	0,3898	1,36	0,175	0,8498-2,4505
LVI	1,5970	0,4430	1,69	0,092	0,9271-2,7506
TB3					
- Bd 1 vs 0	1,8318	0,4820	2,30	0,021	1,0936-3,0683
- Bd 2 vs 0	3,0829	0,9047	3,84	0,000	1,734- -5,4797
	Contrast	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
TB3					
- Bd 1 vs 0	0,6053	0,2631	2,30	0,021	0,0895-1,1211
- Bd 2 vs 0	1,1258	0,2934	3,84	0,000	0,5507-1,7010
- Bd 2 vs 1	0,5205	0,3195	1,63	0,103	-0,1057-1,1468

Tabella 9. Modello multivariato di Cox che include il tumor budding categorizzato secondo il sistema di punteggio proposto da Lugli A., et al., e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni. (PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; TB: tumor budding; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza).

Infine, è stata analizzata la performance prognostica dei modelli mediante c-index di Harrell per valutarne la capacità di stratificazione. I risultati dell'analisi univariata mostrano come il TB3 abbia la migliore capacità di stratificazione prognostica (0,616), seguita dal RG System (0,615) e dall'inclusione della valutazione della TB come variabile continua (0,614). Tutti gli altri score di punteggio e modelli di rischio hanno mostrato una performance prognostica inferiore (Tabella 5). L'analisi multivariata conferma la miglior capacità di stratificazione prognostica del modello TB3 (0,739), seguito dal modello TB1 (0,735) e dal BD model (0,735) (Tabella 6).

I risultati dell'analisi di Kaplan-Meier riferiti alla DSS in base ai differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio del TB sono rappresentati in Figura 25 e 26.

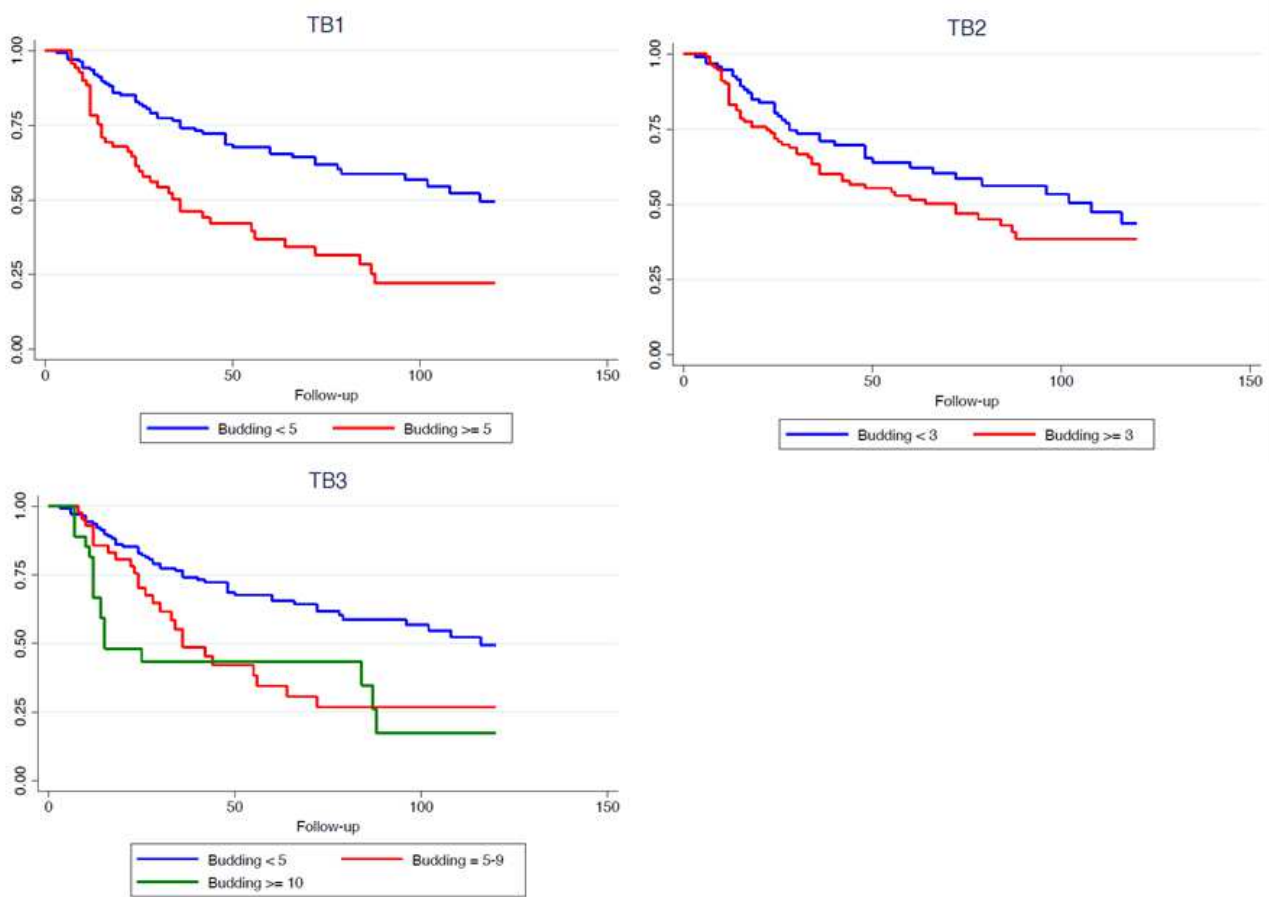


Figura 25. Curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza specifica da malattia in base ai differenti sistemi di punteggio del tumor budding.

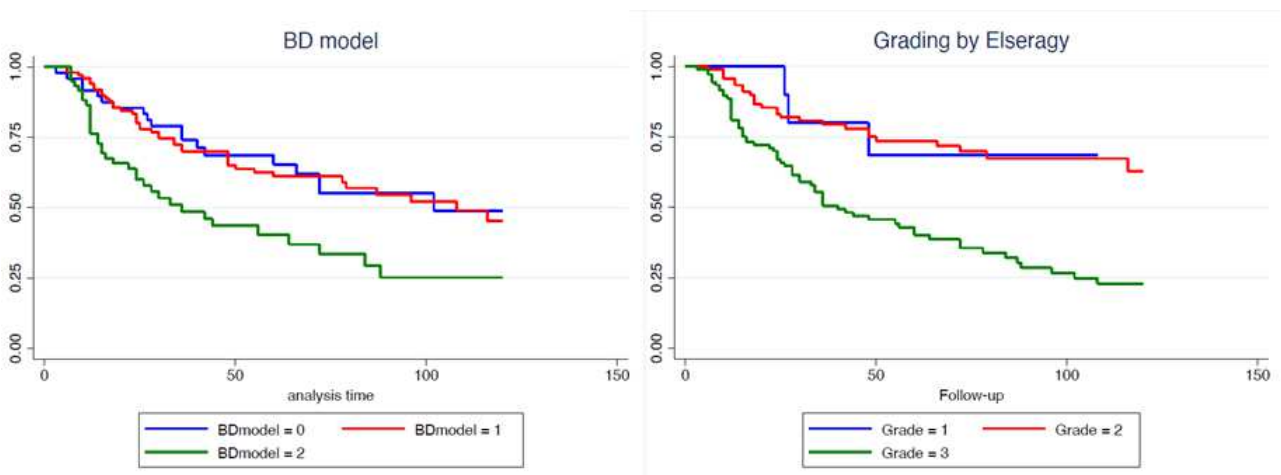


Figura 26. Curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza specifica da malattia in base ai differenti modelli di rischio del tumor budding.

I dati dell'analisi univariata riguardanti il ruolo prognostico del TB per la DFS dimostrano come solamente il sistema TB1 sia stato in grado di predire l'aumento del rischio di recidiva locoregionale nei soggetti con alto numero di TB (HR= 1,80; 95% CI 1,09-2,95; P=0,021) (Tabella 10). Pertanto, le analisi di correlazione multivariata per la DFS non sono state eseguite.

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% CI	AIC	BIC	c-index
TB	1,042	0,0229	1,87	0,062	0,998-1,087	641,1286	644,4804	0,580
TB1	1,795	0,4562	2,30	0,021	1,091-2,954	639,158	642,5099	0,582
TB2	1,328	0,3314	1,14	0,255	0,814-2,166	642,8812	646,2331	0,546
TB3								
- <i>Bd1</i>	1,787	0,5332	1,95	0,052	0,996-3,207	641,1573	647,861	0,582
- <i>Bd2</i>	1,807	0,6421	1,67	0,096	0,901-3,626			
BD model								
- <i>BD1</i>	1,244	0,4075	0,67	0,505	0,654-2,364	643,7315	650,4352	0,564
- <i>BD2</i>	1,724	0,6173	1,52	0,129	0,854-3,478			
RG System								
- <i>RG2</i>	3,602	3,6697	1,26	0,209	0,489-2,653	638,8627	645,5664	0,583
- <i>RG3</i>	5,724	5,8047	1,72	0,085	0,784-4,176			

Tabella 10. Analisi univariata dei differenti sistemi di punteggio e modelli di rischio del tumor budding per la sopravvivenza libera da malattia a 10 anni (TB: tumor budding; RG: Revised Grading; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; AIC: Akaike information criterion; BIC: Bayesian information criterion, c-index: Harrel's c-index).

6.2.2. Tumor-Stroma Ratio

L'analisi di correlazione R per ranghi di Spearman ha dimostrato una relazione significativa fra i parametri morfologici dello stroma tumorale. In particolare, il TSR risulta significativamente associato sia all' immunofenotipo ($\rho=-0,176$; $P=0,010$), sia al TB ($\rho=-0,283$; $P=0,000$). Ulteriormente, il TSR è strettamente correlato con la presenza di LVI ($\rho=-0,176$; $P=0,010$) e con la modalità di invasione; infatti, risulta associato sia al WPOI ($\rho=-0,203$; $P=0,003$), sia al PPOI ($\rho=-0,202$; $P=0,003$) (Tabella 11). Pertanto, all' aumentare della percentuale di stroma tumorale, il numero di TB aumenta, mentre la reazione infiammatoria sia nello stroma sia nell' epitelio neoplastico tendono a ridursi. Inoltre, casi ricchi di stroma sono caratterizzati da pattern infiltrativi avanzati e coinvolgimento linfovaskolare. Applicando uno score dicotomico pari al 50% è stato ottenuto un buon valore di accordo inter-osservatore ($k= 0,807$).

	Età	Genere	Dimensione	Grading	TB	PNI	LVI	WPOI	PPOI	pT	Pn	Stadio	TSR	Immuno fenotipo
Età	$\rho = 1$	-0,179	0,029	-0,222	-	-0,126	-0,160	-0,136	-0,076	-0,025	-0,086	-0,046	-0,043	-0,081
	P = 1	0,009	0,001	0,001	0,104	0,067	0,020	0,048	0,273	0,720	0,214	0,503	0,535	0,242
Genere	$\rho = 1$		0,110	0,109	0,066	0,129	0,164	0,119	0,124	0,102	0,108	0,156	-0,033	0,111
	P = 1		0,117	0,114	0,339	0,062	0,017	0,084	0,073	0,141	0,118	0,024	0,639	0,109
Dimensione	$\rho = 1$			0,136	0,128	0,330	0,053	0,069	0,121	0,675	0,219	0,481	-0,109	-0,030
	P = 1			0,053	0,068	0,000	0,449	0,329	0,086	0,000	0,002	0,000	0,120	0,668
Grading	$\rho = 1$				0,179	0,194	0,158	0,063	-0,026	0,109	0,230	0,250	-0,076	0,142
	P = 1				0,009	0,005	0,022	0,361	0,704	0,116	0,001	0,000	0,271	0,039
TB	$\rho = 1$					0,362	0,112	0,519	0,497	0,215	0,165	0,276	-0,283	0,130
	P = 1					0,000	0,104	0,000	0,000	0,002	0,017	0,000	0,000	0,059
PNI	$\rho = 1$						0,355	0,192	0,216	0,266	0,169	0,255	-0,033	0,056
	P = 1						0,000	0,005	0,002	0,000	0,014	0,000	0,636	0,418
LVI	$\rho = 1$							0,187	0,148	0,108	0,124	0,155	-0,176	0,010
	P = 1							0,006	0,032	0,116	0,073	0,024	0,010	0,879
WPOI	$\rho = 1$								0,763	0,131	0,166	0,192	-0,203	0,032
	P = 1								0,000	0,057	0,016	0,005	0,003	0,646
PPOI									$\rho = 1$	0,188	0,109	0,136	-0,202	0,016

	P = 1	0,006	0,115	0,050	0,003	0,822
pT		$\rho = 1$	0,114	0,497	-0,049	-0,009
	P = 1		0,100	0,000	0,481	0,900
pN			$\rho = 1$	0,789	-0,096	0,066
			P = 1	0,000	0,165	0,339
Stadio				$\rho = 1$	-0,118	0,072
				P = 1	0,086	0,299
TSR					$\rho = 1$	-0,176
					P = 1	0,010
Immuno fenotipo						$\rho = 1$
						P = 1

Tabella 11. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra i dati clinico-patologici dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua inclusi nell'analisi microscopica (TB: tumor budding; PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; DOI: profondità di invasione; PPOI: pattern di invasione prevalente; WPOI: pattern di invasione peggiore; TSR: tumor stroma ratio).

I risultati del modello multivariato di Cox, costruito includendo gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza (età, genere, PNI, stadio), dimostrano come tumori con elevata percentuale di stroma abbiano un rischio di decesso per malattia (HR= 1,96; 95% CI 1,09-3,59; P=0,025) (Tabella 12) e un rischio di recidiva locoregionale (HR= 2,27; 95% CI 1,13-4,53; P=0,021) (Tabella 13) significativamente più elevato rispetto al gruppo di pazienti con stroma scarso.

L'età è stata inclusa come variabile continua, mentre gli altri parametri come variabili categoriali.

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)					
- II vs I	1,4208	0,9365	0,53	0,594	0,3904-5,1718
- III vs I	3,1446	1,9263	1,87	0,061	0,9465-10,4473
- IV vs I	5,0716	2,7971	2,94	0,003	1,7207-14,9488
Genere					
- M	2,1033	0,6943	2,25	0,024	1,1013-4,0170
Età	1,0206	0,0122	1,70	0,089	0,9969-1,0448
PNI					
- Positivo	1,7291	0,5837	1,93	0,053	0,9164-3,2623
TSR					
- Basso	1,956	0,59893	2,25	0,025	1,0899-3,5103

Tabella 12. Modello multivariato di Cox che include il tumor stroma ratio e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (PNI: invasione perineurale; TSR: tumor stroma ratio; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza).

	H.R.	S.E.	Z	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)					
- II vs I	0,4920	0,2444	-1,43	0,153	0,1858-1,3026
- III vs I	1,0700	0,4918	0,15	0,883	0,4348-2,6341
- IV vs I	0,7152	0,3052	-0,79	0,432	0,3100-1,6507
Genere					
- M	1,3151	0,4523	0,80	0,426	0,6702-2,5806
Età	0,9960	0,0111	-0,36	0,720	0,9745-1,0180
PNI					
- Positivo	1,2452	0,4210	0,65	0,517	0,6419-2,4154
TSR					
- Basso	1,956	0,59893	2,25	0,025	1,0899-3,5103

Tabella 13. Modello multivariato di Cox che include il tumor stroma ratio e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza libera da malattia a 10 anni (PNI: invasione perineurale; TSR: tumor stroma ratio; H.R.: hazard ratio; S.E.: errore standard; Z: punteggio standard; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza).

Il modello multivariato di Cox e l'analisi di regressione hanno permesso di sviluppare un nomogramma che mostra le probabilità di DSS a 3 e a 5 anni (Figura 27). Nel nomogramma l'età è stata inserita come variabile continua, mentre la PNI, il TSR, il genere e lo stadio patologico sono state considerate come variabili categoriali. L'analisi della performance prognostica del nomogramma, eseguita mediante c-index di Harrel, ha mostrato buoni valori di discriminazione (0,765). Inoltre, la stima dell'intervallo di confidenza, eseguita mediante tecniche di ricampionamento (bootstrapping), ha dimostrato buoni valori di validazione interna (0,7649). Le probabilità predittive del nomogramma sono state sfruttate per creare una curva ROC, classificando la sopravvivenza in maniera dicotomica (paziente vivo/deceduto), e per definire il valore soglia più performante capace di discriminare i pazienti ad alto e basso rischio sulla base dello score totale del nomogramma. Dai risultati emerge come uno score totale di categorizzazione pari a 15,03 garantisca la miglior affidabilità in termini di performance predittiva. In particolare, è stata calcolata una sensibilità del 83,64% ed una specificità del 76,83%. La performance del nomogramma è stata confrontata con la capacità predittiva della stadiazione patologica di per sé. Il nomogramma ha mostrato valori più elevati di c-index di Harrel (0,765) e valori inferiori di AIC (445,528) rispetto allo Staging (0,715; AIC=454,313). Infine, il nomogramma ha mostrato di superare la stadiazione patologica di per sé nell'analisi delle curve ROC per la DSS sia ad un anno (AUC [area sotto la curva]=0,821 vs AUC=0,701), sia a 3 anni (AUC=0,771 vs AUC=0,575), che a 5 anni (AUC=0,823 vs AUC=0,543) di follow-up (Figure 28, 29 e 30).

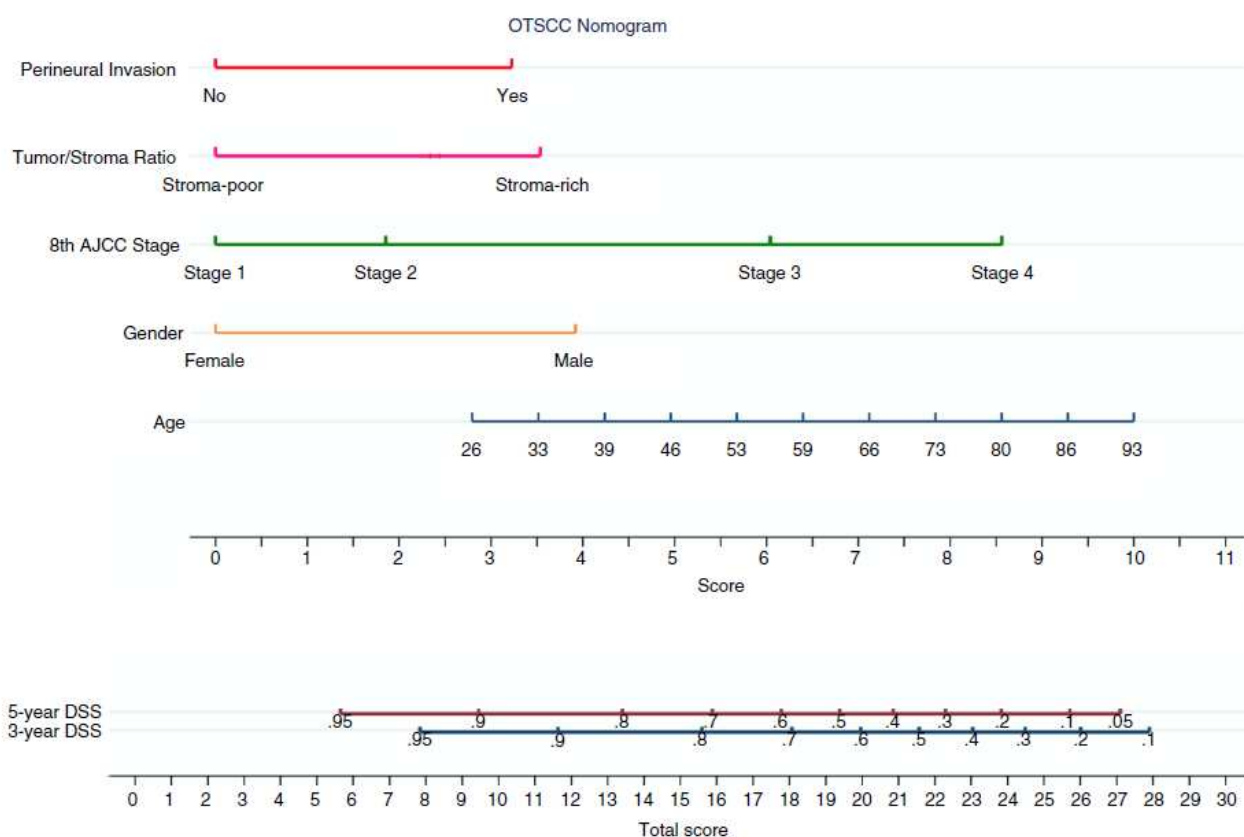


Figura 27. Nomogramma costruito dal modello multivariato di Cox includendo le seguenti variabili: invasione perineurale, tumor stroma ratio, stadio patologico, genere ed età.

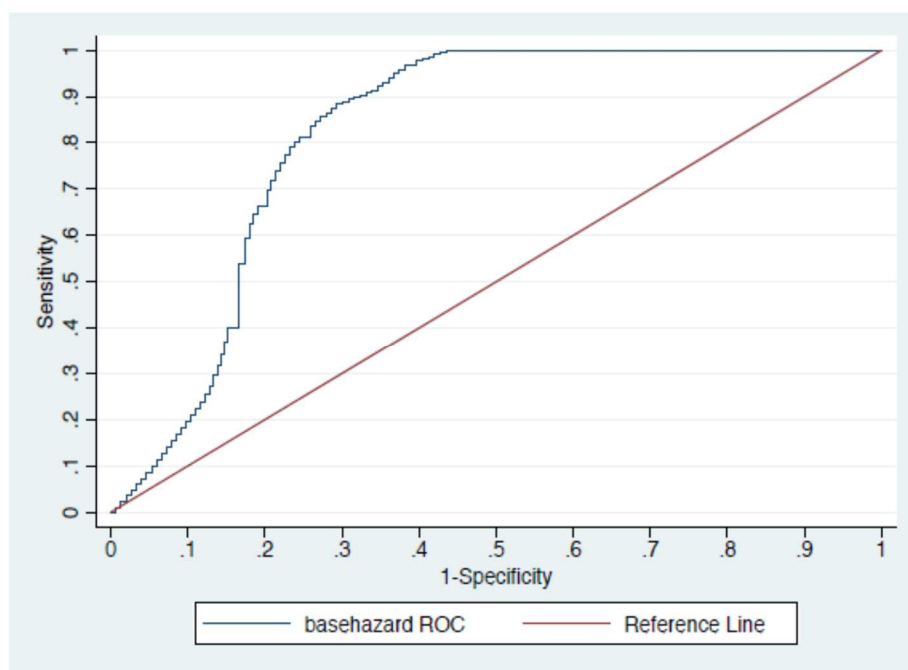


Figura 28. Curva ROC che descrive la sensibilità e la specificità del nomogramma sviluppato dal modello prognostico, per la sopravvivenza specifica da malattia ad un 1 anno di follow-up.

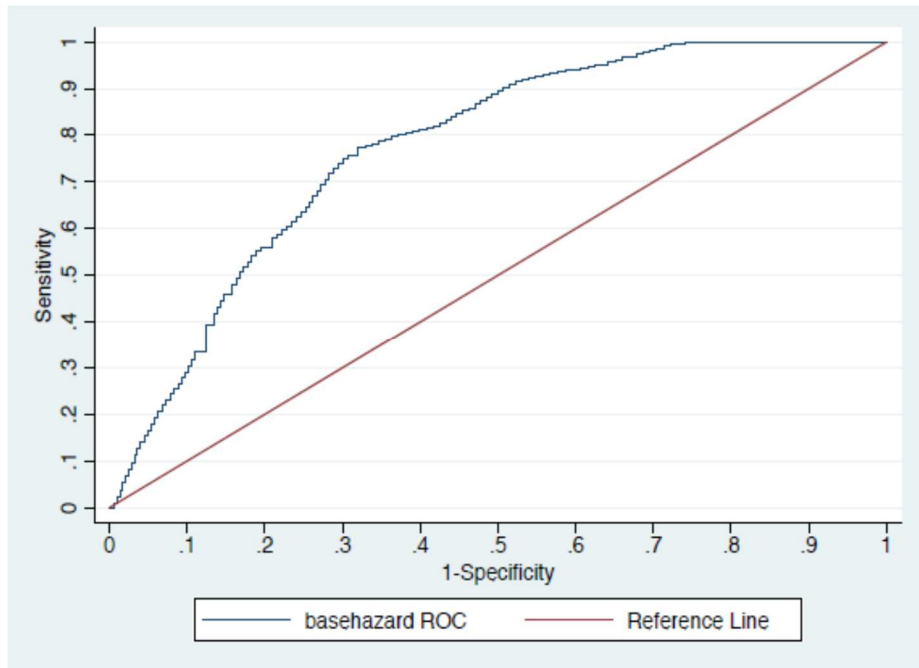


Figura 29. Curva ROC che descrive la sensibilità e la specificità del nomogramma sviluppato dal modello prognostico, per la sopravvivenza specifica da malattia a 3 anni di follow-up.

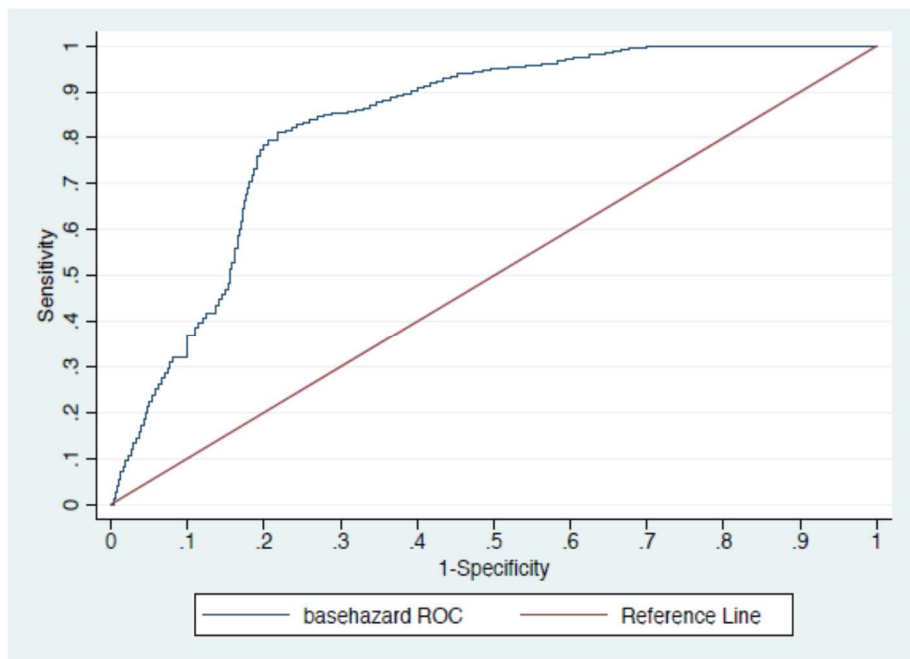


Figura 30. Curva ROC che descrive la sensibilità e la specificità del nomogramma sviluppato dal modello prognostico per la sopravvivenza specifica da malattia a 5 anni di follow-up.

6.2.3. Immunofenotipo

I risultati ottenuti dal test del Chi-quadrato non evidenziano relazioni significative fra il fenotipo tumorale e le caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici (Tabella 14). Applicando la classificazione dei fenotipi tumorali di Chen e Melman è stato ottenuto un accordo inter-osservatore ottimale ($k = 0,886$).

	Immunofenotipo			Valore	Pearson's chi-squared	
	Infiammato	Escluso	Deserto		Df	Sig. two tails
Stadio						
(8° Ed AJCC)						
- <i>I</i>	17	28	6	1,886	6	0,930
- <i>II</i>	23	30	7			
- <i>III</i>	15	26	7			
- <i>IV</i>	22	25	5			
- <i>Totale</i>	77	109	25			
Grading						
(4° Ed. WHO)						
- <i>G1</i>	17	17	4	4,024	4	0,403
- <i>G2</i>	43	59	11			
- <i>G3</i>	17	33	10			
- <i>Totale</i>	77	109	25			
Genere						
- <i>F</i>	48	70	19	1,587	2	0,450
- <i>M</i>	29	39	6			
- <i>Totale</i>	77	109	25			
PNI						
- <i>No</i>	25	42	11	1,832	2	0,400
- <i>Si</i>	51	58	14			
- <i>Totale</i>	76	100	25			

Tabella 14. Chi-square test che analizza le correlazioni fra i fenotipi tumorali e le caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua (F: femmina; M: maschio; PNI: invasione perineurale; Df: grado di libertà).

I dati dell'analisi univariata dimostrano come la sopravvivenza dei pazienti con fenotipo immuno-deserto sia significativamente inferiore rispetto agli altri gruppi, sia in termini di DSS (HR= 2,31; 95% CI 1,34-4,00; P=0,003) (Tabella 15), sia di DFS (HR= 2,41; 95% CI 1,14-4,4; P=0,020) (Tabella 16), che di OS (HR= 2,31; 95% CI 1,35-3,94; P<0,0005). Le rispettive curve di Kaplan-Meier sono rappresentate in Figura 31.

Parametro	H.R.	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)			
- <i>I</i>	1	0,001	
- <i>II</i>	1,995	0,051	0,997-3,992
- <i>III</i>	2,388	0,016	1,174-4,857
- <i>IV</i>	4,293	0,001	2,237-8,236
Grading (4° Ed. WHO)			
- <i>G1</i>	1	0,033	
- <i>G2</i>	0,992	0,978	0,543-1,180
- <i>G3</i>	1,759	0,077	0,940-3,291
Genere			
- <i>F</i>	1		
- <i>M</i>	1,756	0,016	1,110-2,780
Età			
	1,013	0,080	0,998-1,029
PNI			
- <i>Negativo</i>	1		
- <i>Positivo</i>	2,443	0,001	1,506-3,964
Immunofenotipo			
- <i>Infiammato</i>	1	0,001	
- <i>Escluso</i>	0,750	0,218	0,475-1,185
- <i>Deserto</i>	2,309	0,003	1,335-3,995

Tabella 15. Analisi univariata dei differenti fenotipi tumorali e delle caratteristiche clinico-patologiche della corte interna di carcinoma squamocellulare orale della lingua per la sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (H.R.: hazard ratio; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale).

Parametro	H.R.	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)			
- <i>I</i>	1	0,700	
- <i>II</i>	0,778	0,459	0,400-1,513
- <i>III</i>	1,143	0,690	0,593-2,203
- <i>IV</i>	1,085	0,807	0,563-2,091
Grading (4° Ed. WHO)			
- <i>G1</i>	1	0,422	
- <i>G2</i>	1,600	0,224	0,750-3,415
- <i>G3</i>	1,694	0,209	0,745-3,857
Genere			
- <i>F</i>	1		
- <i>M</i>	1,159	0,565	0,702-1,913
Età			
	0,998	0,788	0,981-1,015
PNI			
- <i>Negativo</i>	1		
- <i>Positivo</i>	1,370	0,220	0,828-2,266
Immunofenotipo			
- <i>Infiammato</i>	1	0,026	
- <i>Escluso</i>	0,956	0,869	0,563-1,624
- <i>Deserto</i>	2,241	0,020	1,139-4,411

Tabella 16. Analisi univariata dei differenti fenotipi tumorali e delle caratteristiche clinico-patologiche della corte interna di carcinoma squamocellulare orale della lingua per la sopravvivenza libera da malattia a 10 anni (H.R.: hazard ratio; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale).

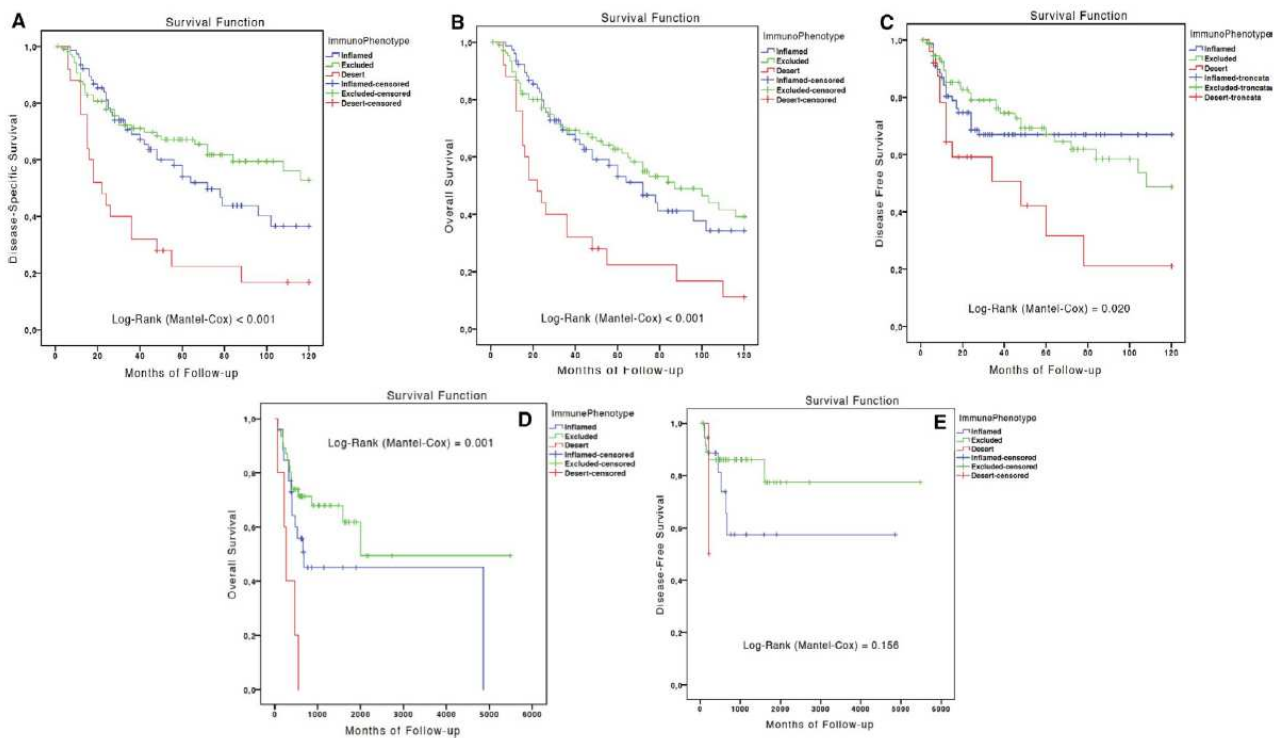


Figura 31. Curve di Kaplan-Meier per sopravvivenza specifica di malattia: (A) sopravvivenza globale (B), e sopravvivenza libera da malattia (C), dei campioni di carcinoma squamocellulare orale della lingua inclusi nello studio. Curve di Kaplan-Meier per sopravvivenza globale (D) e sopravvivenza libera da malattia (E) della corte di pazienti catalogati dal The Cancer Genome Atlas.

Sulla base di tali risultati e degli ulteriori fattori prognostici predittivi di scarsa sopravvivenza (stadio patologico, grading istologico, età, genere e PNI) è stato costruito un modello multivariato di Cox che conferma il valore prognostico del fenotipo tumorale. In particolare, i pazienti con fenotipo immuno-deserto presentano un rischio di mortalità specifica per malattia 2,7 volte maggiore (HR= 2,67; 95% CI 1,50-4,77; P=0,001) (Tabella 17) ed un rischio di recidiva locoregionale 2,3 volte superiore (HR= 2,31; 95% CI 1,12-4,79; P=0,024) rispetto agli altri gruppi (Tabella 18). Inoltre, anche la loro sopravvivenza globale risulta significativamente più scarsa (HR= 2,59; 95% CI 1,47-4,57; P=0,001).

Parametro	H.R.	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)			
- <i>I</i>	1	0,007	
- <i>II</i>	1,804	0,134	0,833-3,907
- <i>III</i>	1,397	0,436	0,602-3,239
- <i>IV</i>	3,117	0,004	1,439-6,750
Grading (4° Ed. AJCC)			
- <i>G1</i>	1	0,572	
- <i>G2</i>	0,702	0,294	0,362-1,360
- <i>G3</i>	0,715	0,378	0,339-1,506
Genere			
- <i>F</i>	1		
- <i>M</i>	1,695	0,039	1,026-2,801
PNI			
- <i>Negativo</i>	1		
- <i>Positivo</i>	2,048	0,012	1,172-3,581
Immunofenotipo			
- <i>Infiammato</i>	1	0,001	
- <i>Escluso</i>	0,884	0,625	0,540-1,448
- <i>Deserto</i>	2,673	0,001	1,497-4,773

Tabella 17. Modello multivariato di Cox che include il fenotipo tumorale e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia a 10 anni (H.R.: hazard ratio; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale).

Parametro	H.R.	P> z 	95% I.C.
Stadio (8° Ed. AJCC)			
- <i>I</i>	1	0,964	
- <i>II</i>	0,943	0,976	0,453-1,966
- <i>III</i>	1,139	0,732	0,541-2,396
- <i>IV</i>	1,032	0,935	0,487-2,185
Grading (4° Ed. WHO)			
- <i>G1</i>	1	0,475	
- <i>G2</i>	1,668	0,223	0,732-3,799
- <i>G3</i>	1,531	0,735	0,598-3,921
Genere			
- <i>F</i>	1		
- <i>M</i>	1,030	0,915	1,601-1,762
PNI			
- <i>Negativo</i>	1		
- <i>Positivo</i>	1,242	0,466	0,694-2,220
Immunofenotipo			
- <i>Infiammato</i>	1	0,028	
- <i>Escluso</i>	0,937	0,819	0,537-1,635
- <i>Deserto</i>	2,313	0,024	1,118-4,786

Tabella 18. Modello multivariato di Cox che include il fenotipo tumorale e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza libera da malattia a 10 anni (H.R.: hazard ratio; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale).

I dati del modello multivariato di Cox, costruito escludendo il grading istologico dalle variabili considerate data la perdita della sua significatività prognostica all'analisi multivariata, hanno parzialmente confermato i risultati ottenuti. In particolare, i pazienti con fenotipo immuno-deserto presentano una DSS (HR= 2,28; 95% CI 1,11-4,70; P=0,025) ed una OS (HR= 2,30; 95% CI 1,12-4,74; P=0,024) significativamente inferiore rispetto agli altri gruppi. Tuttavia, il rischio di recidiva locoregionale, seppur aumentato, non raggiunge la significatività (HR= 2,15; 95% CI 0,94-4,89; P=0,070) (Tabella 19).

Parametro	DSS			DFS		
	H.R.	P> z	95% I.C.	H.R.	P> z	95% I.C.
Stadio						
- I	1	0,007		1	0,964	
- II	1,699	0,419	0,470-6,140	0,615	0,976	0,453-1,966
- III	3,013	0,078	0,882-10,289	1,190	0,732	0,541-2,396
- IV	5,101	0,003	1,712-15,205	0,851	0,935	0,487-2,185
Genere						
- F	1			1		
- M	1,913	0,050	1,001-3,655	1,276	0,915	1,601-1,762
PNI						
- Negativo	1			1		
- Positivo	1,871	0,057	0,982-3,565	1,341	0,405	0,672-2,674
Immunofenotipo						
- Infiam.	1	0,043		1	0,026	
- Escluso	0,932	0,829	0,509-1,707	0,681	0,296	0,344-1,346
- Deserto	2,280	0,025	1,107-4,696	2,146	0,070	0,941-4,893

Tabella 19. Modello multivariato di Cox che include il fenotipo tumorale e gli ulteriori fattori predittivi di scarsa sopravvivenza specifica da malattia e sopravvivenza libera da malattia a 10 anni (DSS: sopravvivenza specifica da malattia; DFS: sopravvivenza libera da malattia; H.R.: hazard ratio; P: p-value; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale; Infiam.: infiammato).

Per eseguire una validazione esterna sulla capacità predittiva dell'immunofenotipo, sono state valutate le sezioni istologiche ed i dati clinici di pazienti affetti da OTSCC, soddisfacenti i criteri di inclusione dello studio, acquisiti dalla piattaforma web Cancer Slide Digital Archie (CSDA) che raccoglie i dati patologici digitali inclusi nel Cancer Genome Atlas (TCGA). I codici sono stati inseriti su <https://cancer.digitalslidearchive.org/> ed i dati clinico-patologici sono stati scaricati dal Genomic Data Commons Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>).

I risultati dell'analisi univariata confermano il valore prognostico del fenotipo immuno-deserto (OS: HR= 3,35; 95% CI 1,19-9,48; P=0,022) (Figura 32); tuttavia, dato il numero limitato di casi (76 pazienti), tali risultati non sono stati convalidati all'analisi multivariata (OS: HR= 2,63; 95% CI 0,62-11,27; P=0,192) (Tabella 20). Solamente cinque casi sono stati classificati come fenotipo immuno-deserto, tutti appartenenti allo stadio patologico moderatamente o altamente avanzato.

Pertanto, non è stato possibile determinare in che termini la prognosi sfavorevole sia stata influenzata dal fenotipo immunitario piuttosto che dallo stadio patologico.

Parametro	Univariata			Multivariata		
	H.R.	P> z	95% I.C.	H.R.	P> z	95% I.C.
Età	1.004	0,790	0,977-1,032	-	-	-
Stadio						
- I	1	0,002		1	0,156	
- II	0,389	0,131	0,114-1,325	0,327	0,200	0,059-1,806
- III	0,246	0,039	0,065-0,931	0,330	0,169	0,068-1,604
- IV	1,333	0,604	0,449-3,956	1,039	0,956	0,269-4,008
Grading						
- G1	1	0,230		-	-	-
- G2	1,808	0,343	0,532-6,143	-	-	-
- G3	2,824	0,111	0,786-10,144	-	-	-
Genere						
- F	1			1		
- M	1,596	0,174	0,8134-3,130	0,564	0,189	0,240-1,326
PNI						
- Negativo	1			1		
- Positivo	1,752	0,215	0,722-4,253	1,645	0,316	0,622-4,349
Immunofenotipo						
- Infiam.	1	0,003		1	0,177	
- Escluso	0,555	0,112	0,269-1,147	0,685	0,433	0,267-1,763
- Deserto	3,354	0,022	1,187-9,479	2,634	0,192	0,615-11,272

Tabella 20. Analisi univariata e multivariata che include il fenotipo tumorale per la sopravvivenza globale a 10 anni della corte di campioni del database TCGA (H.R.: hazard ratio; P: p-value; Z: punteggio standard; I.C. intervallo di confidenza; PNI: invasione perineurale; Infiam.: infiammato).

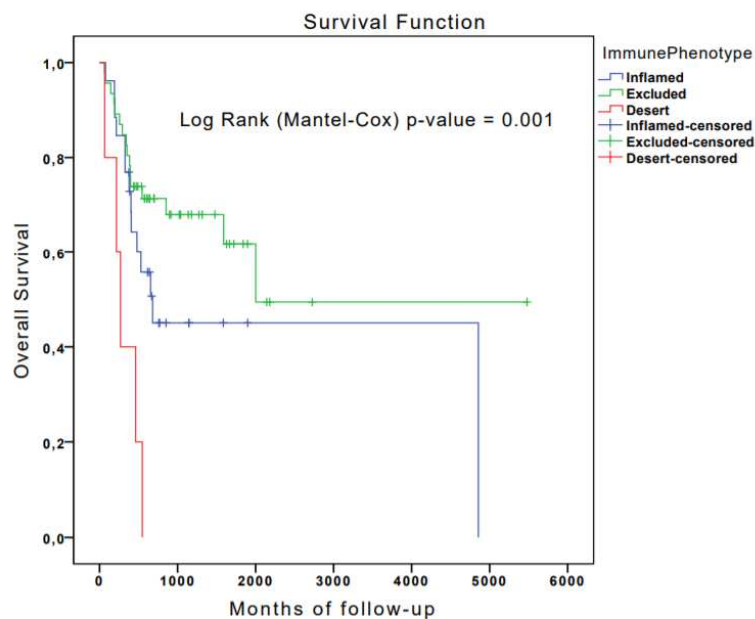


Figura 32. Curve di Kaplan-Meier per l'analisi univariata dell'immunofenotipo per la sopravvivenza globale a 10 anni della corte di campioni del database TCGA.

6.3. CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEI CASI SOTTOPOSTI A MICROTOMOGRRAFIA A LUCE DI SINCROTRONE

Fra i campioni chirurgici selezionati per l'analisi di microtomografia a luce di sincrotrone, 35 casi sono risultati idonei alla valutazione morfometrica, di cui 23 soggetti (65,7%) di genere maschile e 12 soggetti (34,3%) di genere femminile. L'età media alla diagnosi è risultata di $64,4 \pm 16,1$ anni (range: 25-91 anni), superiore nel genere maschile ($65,2 \pm 15,7$ anni) rispetto a quello femminile ($62,9 \pm 17,3$ anni). Il diametro massimo dei tumori è pari a $3,1 \pm 1,6$ cm (range: 0,3-7,0 cm) ed i margini di resezione sono risultati positivi in 18 pazienti (51,4%). Secondo il Grading istologico della 4° Edizione del WHO, oltre la metà dei casi ha presentato scarsa differenziazione (G3: 51,4%), mentre il 40% (14 pazienti) e l'8,7% (3 pazienti) dei casi è stato classificato rispettivamente come G2 e G1. La valutazione del parametro pT secondo la 8° Edizione del Cancer Staging Manual (AJCC) ha classificato 12 casi come pT1 (34,3%), 17 casi come pT2 (48,6%), 4 casi come pT3 (11,4%) e 2 casi come pT4 (5,7%). Riguardo al parametro pN, 17 pazienti non hanno manifestato metastasi linfonodali (48,6%), mentre 18 sono stati classificati come pN1 (48,7%) e 8 come pN2 (22,9%). Le metastasi a distanza sono state diagnosticate solamente in un soggetto. Complessivamente, 7 pazienti sono stati classificati in Stadio I (20,0%), 8 in Stadio II (22,9%), 11 in Stadio III (31,4%) e 9 in Stadio IV (25,7%). La presenza di PNI è stata riscontrata nel 42,9% dei casi e classificata come plurifocale nel 80% di essi, mentre la presenza di LVI ha interessato esclusivamente 4 pazienti (11,4%). Per tutti i casi è stato possibile definire il WPOI, in particolare: un WPOI-1 è stato attribuito a 8 casi (22,9%), un WPOI-2 a 3 casi (8,7%), un WPOI-3 ed un WPOI-4 rispettivamente a 12 casi (34,3%) ciascuno. Analogamente, è stato valutato il PPOI in tutti i casi considerati: 10 casi hanno mostrato un PPOI-1 (28,6%), 5 casi un PPOI-2 (14,3%), 15 casi un PPOI-3 (42,9%) e 5 casi un PPOI-4 (14,3%). Il valore del TSR è risultato ampiamente variabile dallo 0% al 70%, con valore medio di stroma tumorale pari a $25,1 \pm 22,4$ %. Classificando il TSR in maniera dicotomica, applicando un cut-off pari al 50%, solamente 6 casi (17,1%) hanno registrato un basso valore di TSR, mentre 29 casi (82,9%) hanno presentato una scarsa percentuale di stroma tumorale. Analizzando l'immunofenotipo, quello immuno-escluso è risultato il fenotipo prevalente (18 casi), seguito dall' immuno-infiammato (12 casi) e dal fenotipo immuno-deserto (5 casi). Il numero medio di buds tumorali è risultato pari a $5,7 \pm 6,7$ (range: 0-26) e sono stati definiti come pazienti ad alto rischio, per un elevato numero di TB, il 42,9% (15 casi), il 62,9% (22 casi) ed il 17,1% (6 casi) dei soggetti, classificati rispettivamente secondo il sistema TB1, TB2 e TB3. Il periodo di follow-up medio è stato stimato a $40,9 \pm 35,6$ mesi, variabile da 6 a 120 mesi. Le recidive locoregionali hanno coinvolto il 28,7% dei pazienti e si sono verificate mediante dopo 24,5

$\pm 22,0$ mesi (range: 6-64 mesi) dal trattamento chirurgico iniziale. Il 65,7% dei soggetti è deceduto per malattia, dopo un intervallo di tempo medio pari a $27,6 \pm 19,6$ mesi (range: 8-84 mesi). Le principali caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici inclusi nella analisi di microtomografia sono riassunte in Tabella 21.

Parametro	n. (%)	Media \pm DS (range)
Età		64,4 \pm 16,1 (25 - 91)
Genere		
- <i>M</i>	23 (65,7)	
- <i>F</i>	12 (34,3)	
Dimensione (cm)		3,1 \pm 1,6 (0,3 - 7)
Margini		
- <i>Positivi</i>	18 (51,4)	
- <i>Negativi</i>	17 (48,6)	
Grading (4 th ed. WHO)		
- <i>G1</i>	3 (8,7)	
- <i>G2</i>	14 (40,0)	
- <i>G3</i>	18 (51,4)	
pT (8° Ed. AJCC)		
- <i>1</i>	12 (34,3)	
- <i>2</i>	17 (48,6)	
- <i>3</i>	4 (11,4)	
- <i>4</i>	2 (5,7)	
pN (8° Ed. AJCC)		
- <i>1</i>	17 (48,6)	
- <i>2</i>	10 (28,7)	
- <i>3</i>	8 (22,9)	
Staging (8° Ed. AJCC)		
- <i>I</i>	7 (20,0)	
- <i>II</i>	8 (22,9)	
- <i>III</i>	11 (31,4)	
- <i>IV</i>	9 (25,7)	
PNI		
- <i>Positivo</i>	15 (42,9)	
Focale	3 (20,0)	
Multifocale	12 (80,0)	
Intratumorale	3 (20,0)	
Peritumorale	12 (80,0)	
- <i>Negativo</i>	20 (57,1)	
LVI		
- <i>Positivo</i>	4 (11,4)	
- <i>Negativo</i>	31 (88,6)	
WPOI		
- <i>1</i>	8 (22,9)	
- <i>2</i>	3 (8,7)	
- <i>3</i>	12 (34,3)	
- <i>4</i>	12 (34,3)	

PPOI		
-	1	10 (28,6)
-	2	5 (14,3)
-	3	15 (42,9)
-	4	5 (14,3)
Tumor Budding		5,7 ± 6,7 (0 - 26)
-	<i>TB1</i>	
	< 5 buds / x20	20 (57,1)
	≥ 5 buds / x20	15 (42,9)
-	<i>TB2</i>	
	< 3 buds / x20	13 (37,1)
	≥ 3 buds / x20	22 (62,9)
-	<i>TB3</i>	
	<i>Bd0</i>	20 (57,1)
	<i>Bd1</i>	9 (25,7)
	<i>Bd2</i>	6 (17,1)
TSR		
-	<i>Alto</i>	6 (17,1)
-	<i>Basso</i>	29 (82,9)
Immunofenotipo		
-	<i>Inflammato</i>	12 (34,3)
-	<i>Escluso</i>	18 (51,4)
-	<i>Deserto</i>	5 (14,3)

Tabella 21. Principali caratteristiche clinico-patologiche dei campioni chirurgici di carcinoma squamocellulare orale della lingua inclusi nell' analisi di microtomografia a luce di sincrotrone. (M: maschio; F: femmina; G: grading; PNI: invasione perineurale; LVI: invasione linfovaskolare; PPOI: pattern di invasione prevalente; WPOI: pattern di invasione peggiore; TSR: Tumor Stroma ratio; DS: deviazione standard; WHO: World Health Organization; AJCC: American Joint Committee on Cancer).

6.4. ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI ED ESTRAZIONE DEI DATI VOLUMETRICI

Le caratteristiche quantitative e qualitative del materiale prelevato per la microtomografia a luce di sincrotrone ha consentito nella totalità dei casi l'estrazione dei volumi, la segmentazione bidimensionale, nei piani frontale, longitudinale e trasversale, e l'analisi tridimensionale degli indici strutturali dello stroma extratumorale, del fronte infiltrativo e dello stroma intratumorale, rappresentanti, stratificati per stadio patologico, nelle Figura 33 – 40.

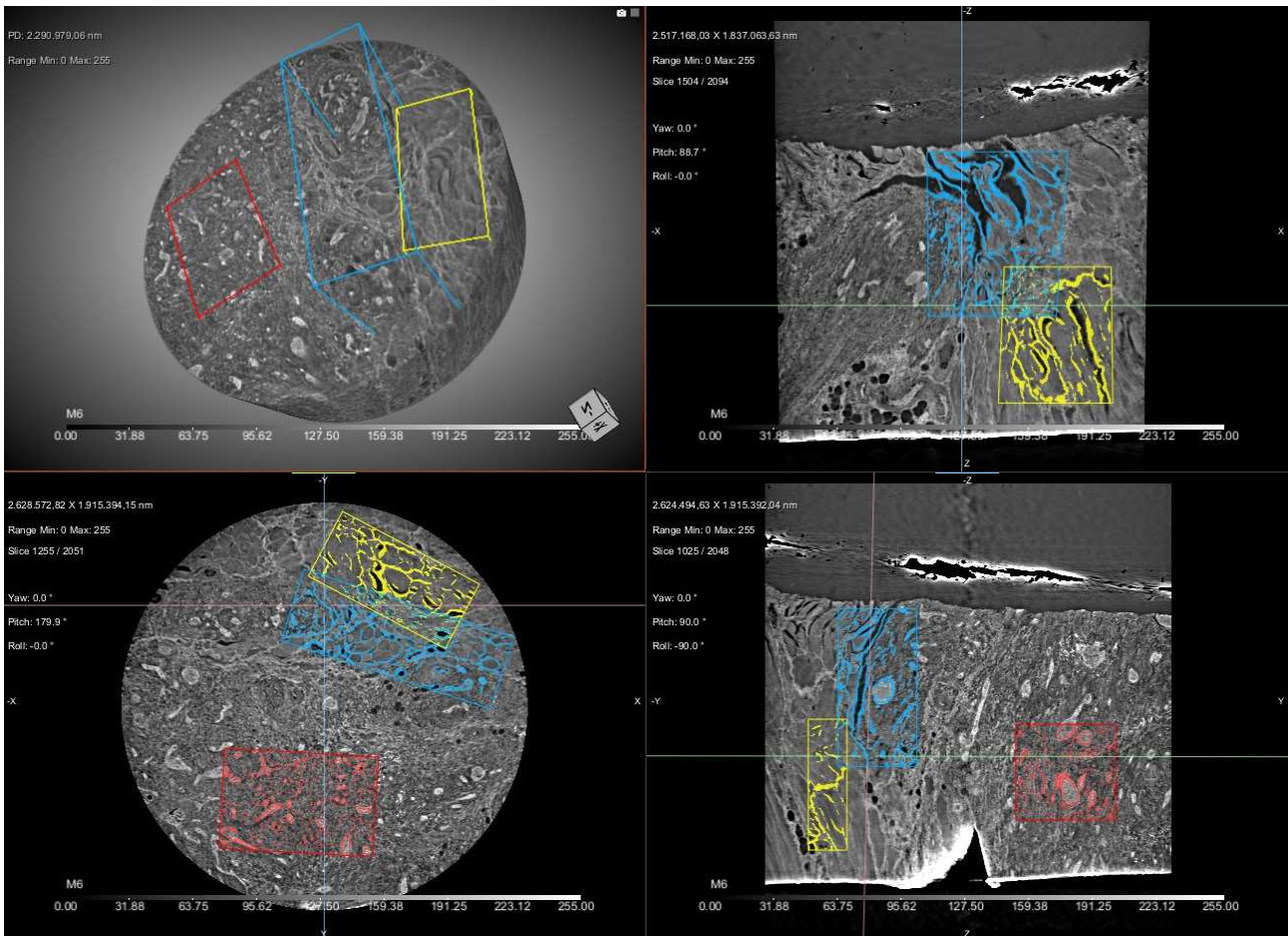


Figura 33. In senso orario: rappresentazione tridimensionale e bidimensionale, sul piano longitudinale, frontale e trasversale dei volumi estratti dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua di stadio patologico I.

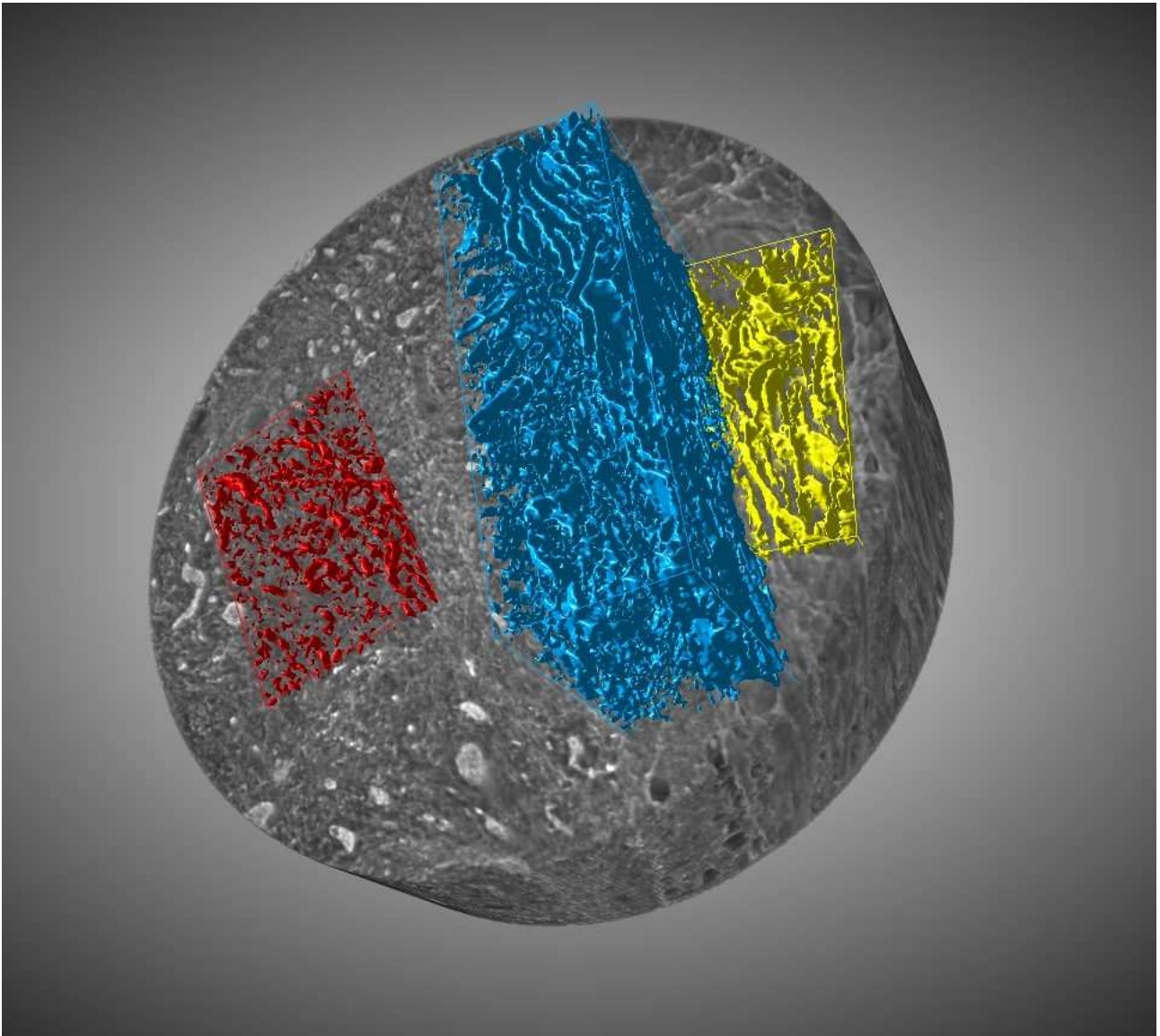


Figura 34. Rappresentazione tridimensionale dei volumi dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua di Stadio I. I volumi estratti evidenziano gli indici strutturali dei fasci di fibre collagene che compongono lo stroma tumorale.

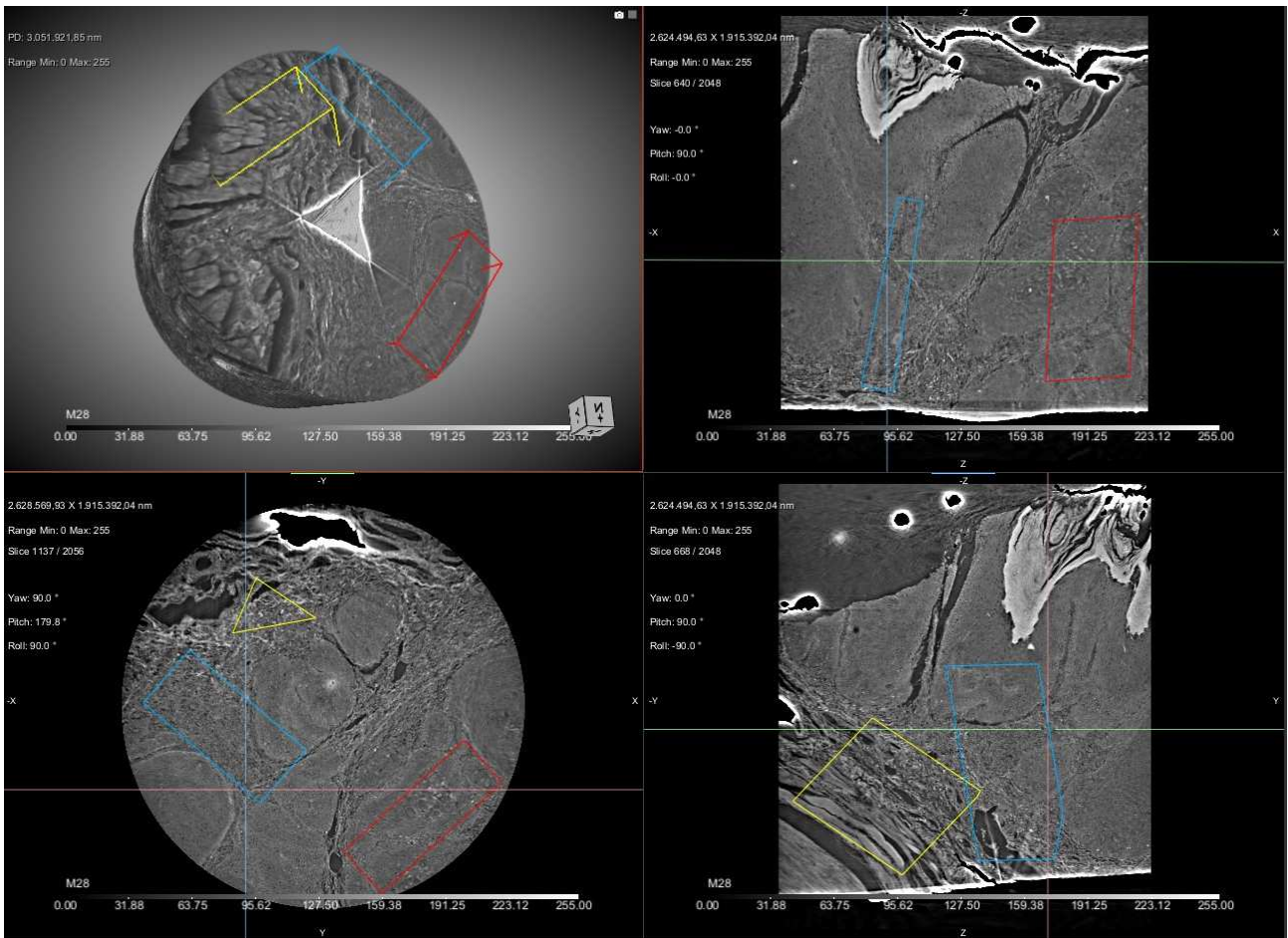


Figura 35. In senso orario: rappresentazione tridimensionale e bidimensionale, sul piano longitudinale, frontale e trasversale dei volumi estratti dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua di stadio patologico II.

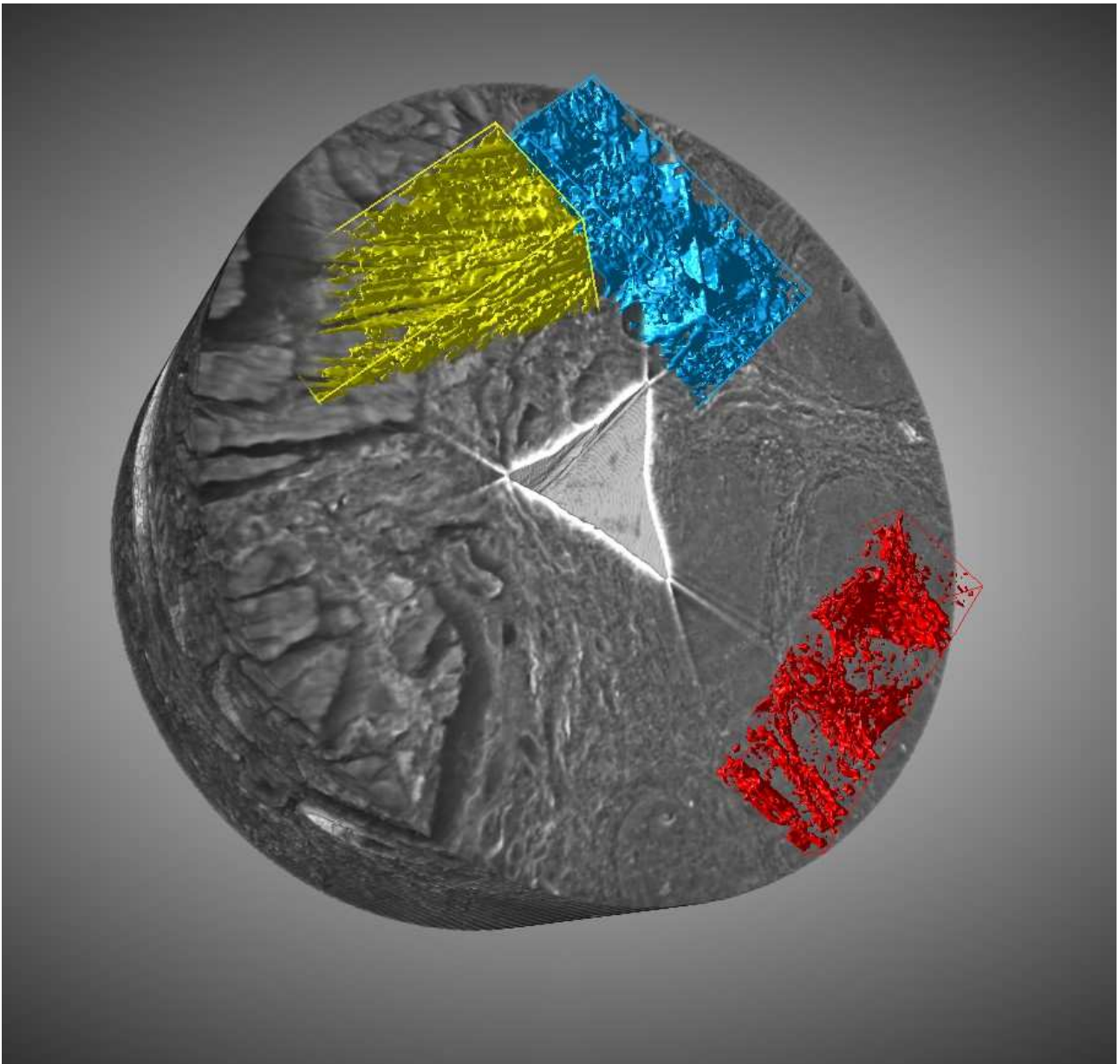


Figura 36. Rappresentazione tridimensionale dei volumi dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua di Stadio II. I volumi estratti evidenziano gli indici strutturali dei fasci di fibre collagene che compongono lo stroma tumorale.

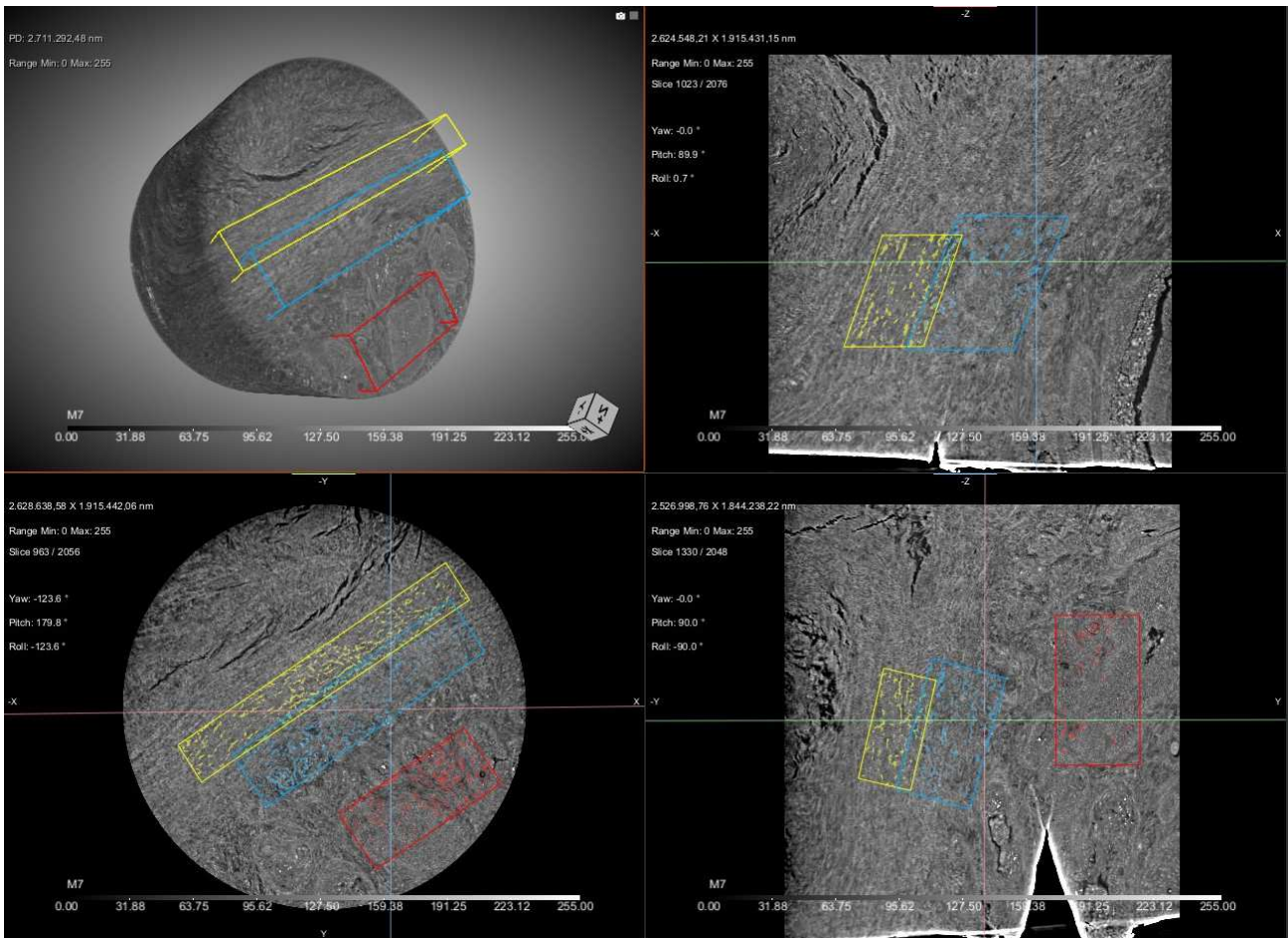


Figura 37. In senso orario: rappresentazione tridimensionale e bidimensionale, sul piano longitudinale, frontale e trasversale dei volumi estratti dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua di stadio patologico III.

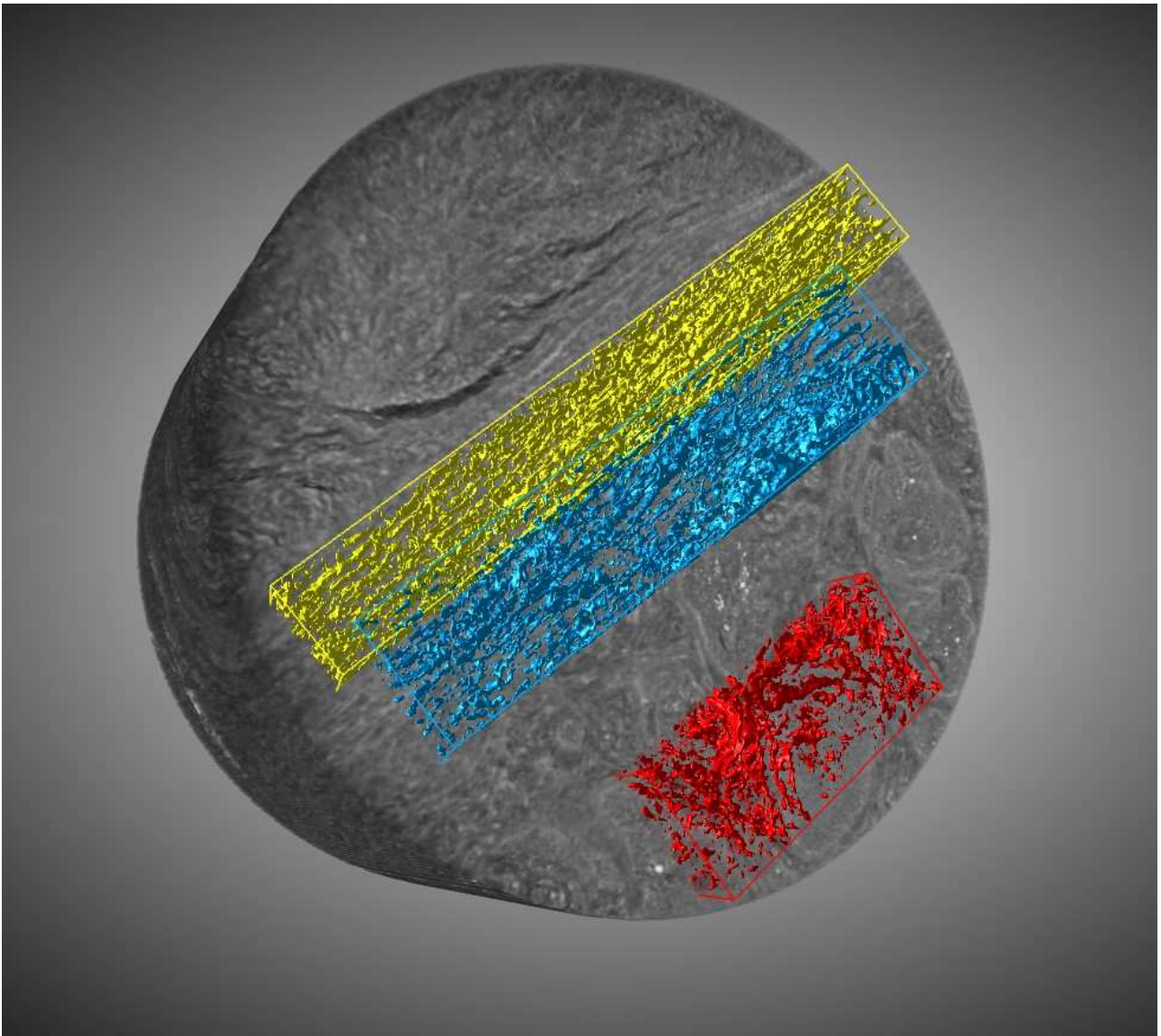


Figura 38. Rappresentazione tridimensionale dei volumi dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua di Stadio III. I volumi estratti evidenziano gli indici strutturali dei fasci di fibre collagene che compongono lo stroma tumorale.

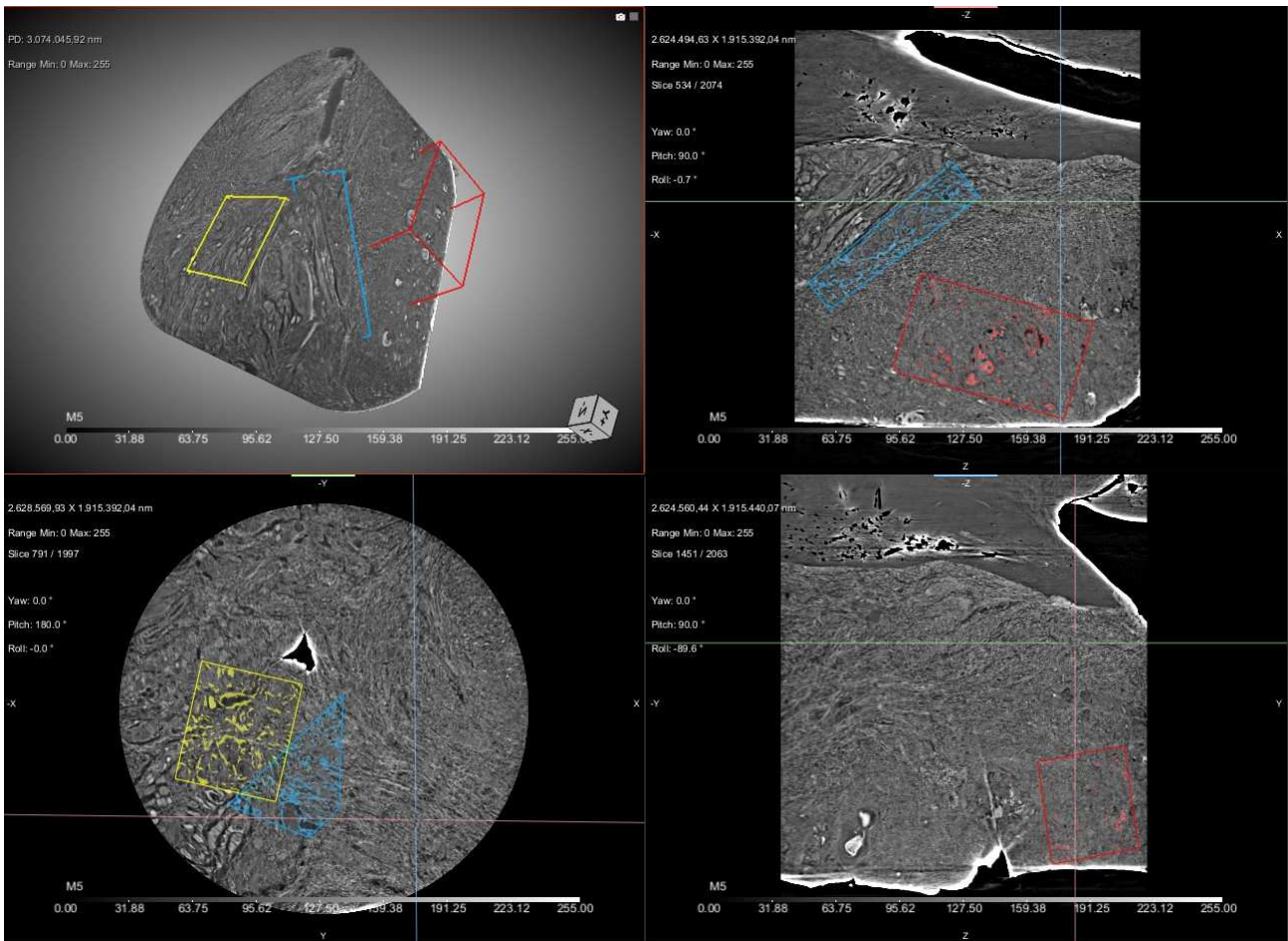


Figura 39. In senso orario: rappresentazione tridimensionale e bidimensionale, sul piano longitudinale, frontale e trasversale dei volumi estratti dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un campione di carcinoma squamocellulare orale della lingua di stadio patologico IV.

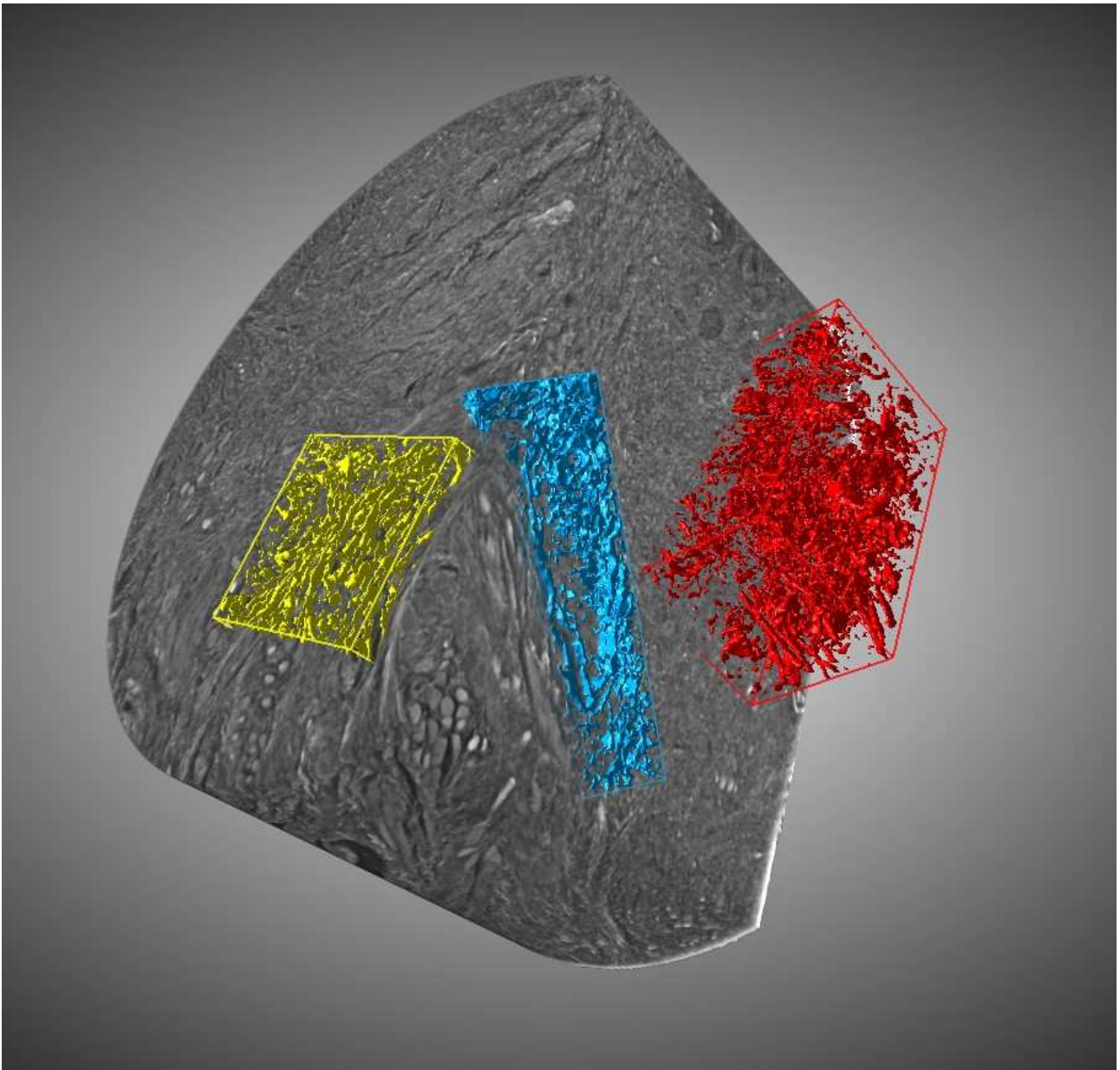


Figura 40. Rappresentazione tridimensionale dei volumi dello stroma extratumorale (giallo), intratumorale (rosso) e del fronte infiltrativo (azzurro) di un caso di carcinoma squamocellulare orale della lingua di Stadio IV. I volumi estratti evidenziano gli indici strutturali dei fasci di fibre collagene che compongono lo stroma tumorale.

6.5. ANALISI DELLA VARIANZA DEGLI INDICI STRUTTURALI DELLO STROMA TUMORALE

L'analisi della varianza degli indici strutturali valutati nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale è stata eseguita mediante il test ANOVA a misure ripetute per valori ottenuti da gruppi non indipendenti.

Lo spessore medio delle fibre collagene dello stroma extratumorale, del fronte infiltrativo e dello stroma intratumorale è risultato rispettivamente pari a $7,26 \pm 0,77 \mu\text{m}$ (range: 5,34-8,45 μm), $6,94 \pm 0,55 \mu\text{m}$ (range: 5,61-8,50 μm) ed a $6,60 \pm 0,62 \mu\text{m}$ (range: 5,70-7,80 μm).

In particolare, le fibre collagene più lontane dalla massa tumorale e dalla zona di invasione neoplastica attiva risultano significativamente più spesse, sia rispetto a quelle localizzate sul fronte di invasione ($P=0,0062$), sia rispetto a quelle disperse fra le cellule epiteliali neoplastiche ($P=0,0001$). Inoltre, seppur meno significative, differenze sono emerse anche confrontando lo spessore delle fibre collagene del fronte infiltrativo e dello stroma intratumorale ($P=0,0136$). Pertanto, avvicinandosi all'epitelio neoplastico si assiste ad una graduale riduzione dello spessore delle fibre collagene che compongono lo stroma (Figura 41).

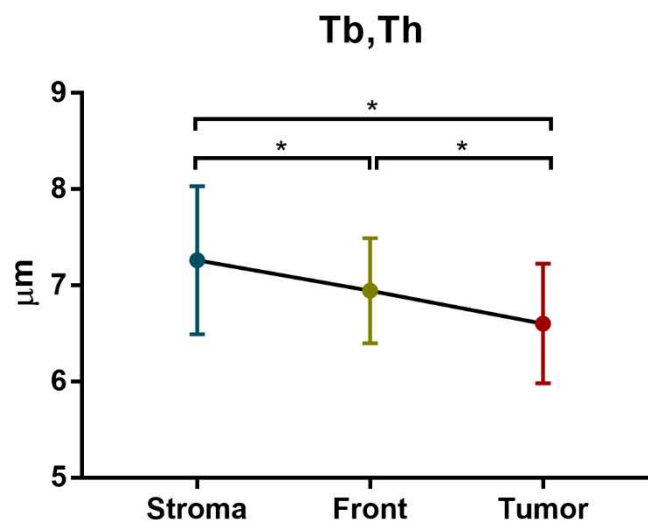


Figura 41. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi allo spessore delle fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (Tb,Th: spessore delle fibre collagene).

Analizzando la distanza presente fra i fasci di fibre collagene, emerge come questa risulti significativamente ridotta nello stroma extratumorale ($20,31 \pm 2,70 \mu\text{m}$) sia rispetto al fronte infiltrativo ($23,56 \pm 5,60$; $P=0,0040$), sia rispetto allo stroma intratumorale ($P=0,0011$), che ha mostrato il valore medio di Tb,Sp più elevato ($24,68 \pm 6,30 \mu\text{m}$) e la maggior varianza (range: 14,90-41,50 μm) (Figura 42).

Pertanto, in prossimità della massa tumorale centrale le fibre collagene risultano più sottili e maggiormente distanziate le une dalle altre, supportando la teoria secondo cui fibre più spesse e ravvicinate indichino la presenza di un collagene maturo e fisiologico, riconducibile a Collagene di tipo I, mentre quelle più sottili e distanziate (Collagene tipo III) siano caratteristiche di un collagene immaturo, associato a condizioni patologiche ed a neoplasie poco differenziate ed infiltrative.

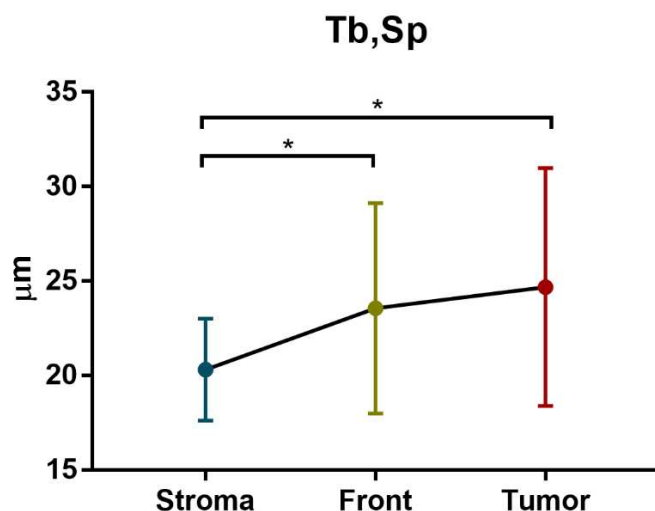


Figura 42. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi alla distanza fra le fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (Tb,Sp: distanza fra le fibre collagene; µm: micrometro).

Al contrario, l'indice del grado di anisotropia, compreso fra valori di 0 ed 1, è risultato significativamente più elevato nello stroma extratumorale ($0,56 \pm 0,13$; range: 0,24-0,85) sia rispetto al fronte infiltrativo ($0,5 \pm 0,11$; range: 0,26-0,73; $P=0,0032$), sia rispetto allo stroma intratumorale ($0,46 \pm 0,13$; range: 0,27-0,76; $P=0,0023$) (Figura 43).

Pertanto, il collagene dello stroma extratumorale tende maggiormente ad una condizione anisotropica, ovvero le sue proprietà dipendono maggiormente dalla direzione lungo la quale esse vengono analizzate. Di conseguenza, tali fibre tendono a presentare una direzione preferenziale e ad essere maggiormente orientate e ben disposte, conferendo al tessuto una miglior organizzazione e una miglior funzionalità. Al contrario, il collagene della massa neoplastica centrale, essendo più vicino al grado di isotropia, non mostra una direzione preferenziale e le sue proprietà restano confinate al singolo piano od asse in cui vengono analizzate, risultando in un tessuto più disorganizzato, casualmente arrangiato e meno funzionale.

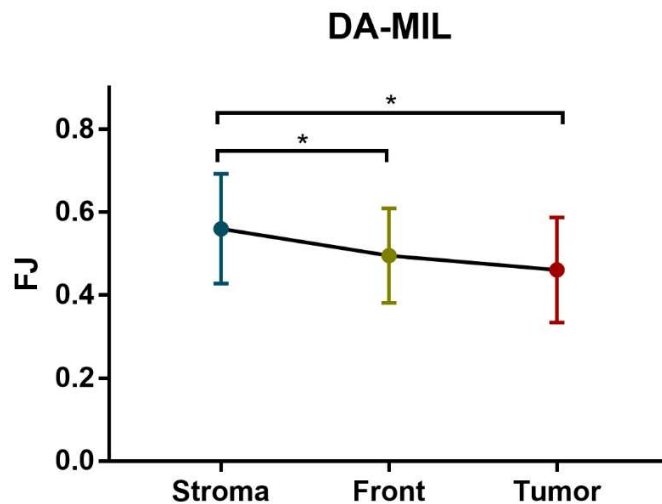


Figura 43. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi al grado di anisotropia delle fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (DA-MIL: indice del grado di anisotropia).

Analogamente, la dimensione frattale, compresa fra valori di 2 e 3, è risultata significativamente più elevata nello stroma extratumorale ($2,69 \pm 0,07$; range: 2,43-2,86) rispetto al fronte infiltrativo ($2,64 \pm 0,11$; range: 2,42-2,78; $P=0,0245$) ed ancor di più rispetto allo stroma intratumorale ($2,60 \pm 0,14$; range: 2,20-2,71; $P=0,0007$) (Figura 44).

Il collagene dello stroma extratumorale tende ad occupare un volume più elevato di spazio in tutte le sue direzioni, ripetendosi in maniera ricorsiva e non casuale. Pertanto, fibre collagene più ramificate e preferenzialmente ordinate potrebbero conferire allo stroma lontano dal tumore una miglior funzionalità strutturale. Al contrario, a livello del fronte infiltrativo e della massa neoplastica, le cellule tumorali in proliferazione ed in fase di invasione tumorale attiva potrebbero promuovere l'alterazione delle fibre collagene, esitando in uno stroma modificato.

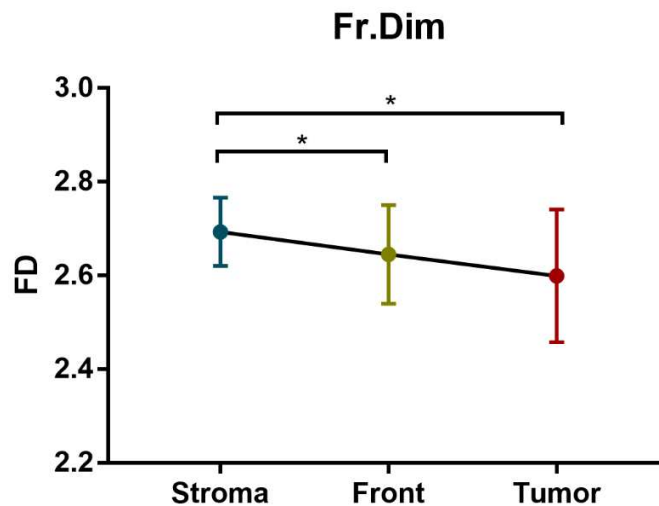


Figura 44. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi alla dimensione frattale delle fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (Fr.Dim: dimensione frattale; FD: fractal dimensions).

Anche calcolando la densità connettivale, lo stroma extratumorale ha presentato il valore medio più elevato, pari a $6,05 \times 10^{-5} \pm 2,92 \times 10^{-5} \mu\text{m}^{-3}$, significativamente più alto rispetto a quello ottenuto a livello del fronte infiltrativo ($4,34 \times 10^{-5} \pm 3,13 \times 10^{-5} \mu\text{m}^{-3}$; $P=0,0114$) e del tumore ($3,49 \times 10^{-5} \pm 4,61 \times 10^{-5} \mu\text{m}^{-3}$; $P=0,0052$) (Figura 45). Le fibre collagene dello stroma extratumorale presentano un maggior grado di connessione; pertanto, conferiscono al tessuto maggior funzionalità e miglior organizzazione tridimensionale. Al contrario, il collagene del fronte infiltrativo ed intratumorale, essendo scarsamente interconnesso, risulta in uno stroma notevolmente più lasso.

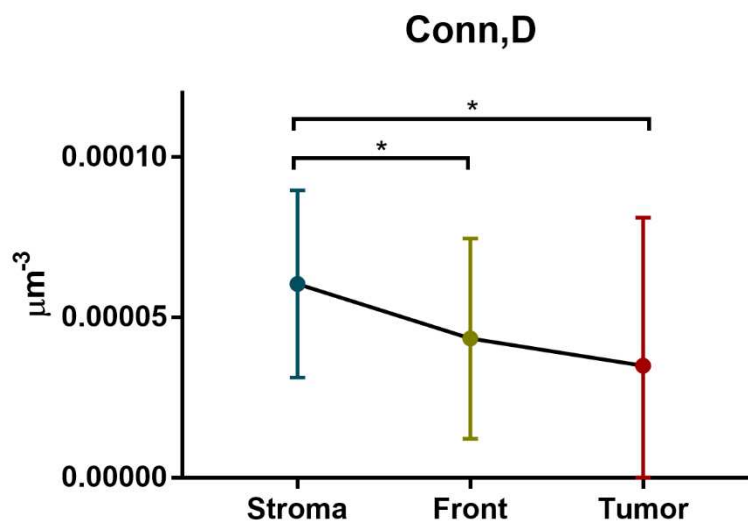


Figura 45. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi alla densità connettivale delle fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (Conn,D: densità connettivale; μm : micrometro).

Infine, il volume occupato dalle fibre collagene aumenta significativamente passando dallo stroma tumorale ($15,0\% \pm 5,3\%$; range: 7,0-26,7%; $P < 0,0001$), al fronte infiltrativo ($18,0\% \pm 4,4\%$; range: 8,2-25,0%; $P = 0,0031$), fino allo stroma extratumorale ($22,0\% \pm 5,1\%$; range: 9,5-35,8%; $P < 0,0001$) (Figura 46).

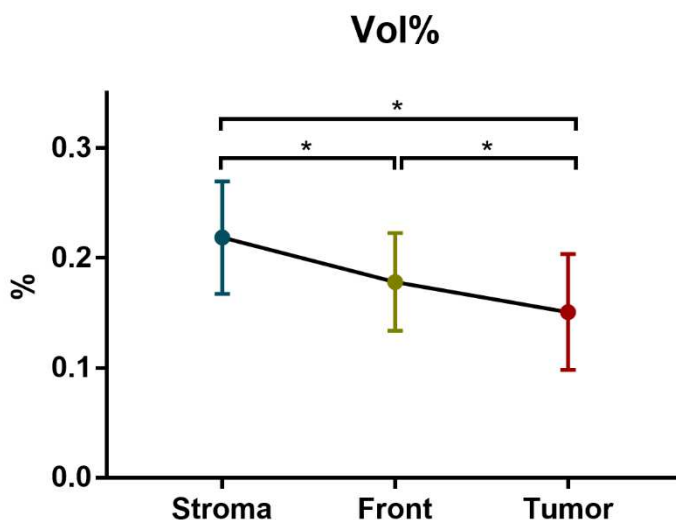


Figura 46. Box plot che descrive la distribuzione dei dati relativi al volume percentuale delle fibre collagene nello stroma extratumorale, nel fronte infiltrativo e nello stroma intratumorale (Vol%: volume percentuale).

6.6. ANALISI DI CORRELAZIONE FRA GLI INDICI STRUTTURALI DELLO STROMA TUMORALE

L'analisi di correlazione degli indici strutturali eseguita mediante analisi R per ranghi di Spearman dimostra come lo spessore delle fibre collagene sia correlato significativamente con la dimensione frattale ed il volume percentuale, sia a livello dello stroma extratumorale (Fr.Dim: $\rho = 0,490$; $P = 0,003$; Vol%: $\rho = 0,799$; $P < 0,0005$), sia nel fronte infiltrativo (Fr.Dim: $\rho = 0,405$; $P = 0,016$; Vol%: $\rho = 0,606$; $P < 0,0005$), che nello stroma intratumorale (Fr.Dim: $\rho = 0,545$; $P = 0,001$; Vol%: $\rho = 0,598$; $P < 0,0005$). Pertanto, più alto è lo spessore delle fibre più queste tendono a ricorrere in maniera ordinata secondo una direzione preferenziale e ad occupare un maggior volume spaziale.

In particolare, la forza di associazione fra spessore delle fibre e volume percentuale aumenta più ci si allontana dalla porzione centrale del tumore, data la presenza di un maggior numero di fibre spesse e ravvicinate proprio nello stroma extratumorale.

Nella massa neoplastica lo spessore delle fibre correla positivamente anche con il grado di anisotropia ($\rho = 0,341$; $P = 0,045$) e la densità connettivale ($\rho = 0,365$; $P = 0,031$), mentre si associa negativamente con la distanza inter-fibrillare ($\rho = -0,347$; $P = 0,041$). Quindi, sebbene nello stroma

intratumorale siano numericamente inferiori, le fibre di calibro maggiore risultano più ravvicinate, densamente connesse e ricorsive, caratteristiche che ricordano una distribuzione fisiologica del collagene.

La distanza fra le fibre aumenta significativamente al ridursi della dimensione frattale, del volume percentuale e della densità connettivale, in quanto, più sono distanziate, minore sarà il numero di fibre presenti per micrometro cubo, più lassa sarà la loro connessione e più casuale la loro distribuzione. Anche in questo caso la forza di associazione risulta più forte nello stroma intratumorale (Fr.Dim: $\rho=-0,911$; $P<0,0005$; Conn,D: $\rho=-0,894$; $P<0,0005$; Vol%: $\rho=-0,901$; $P<0,0005$) e nel fronte infiltrativo (Fr.Dim: $\rho=-0,790$; $P<0,0005$; Conn,D: $\rho=-0,854$; $P<0,0005$; Vol%: $\rho=-0,796$; $P<0,0005$) rispetto allo stroma extratumorale (Fr.Dim: $\rho=-0,596$; $P<0,0005$; Conn,D: $\rho=-0,720$; $P<0,0005$; Vol%: $\rho=-0,571$; $P=0,001$), supportando l'ipotesi che lo stroma adiacente al tumore e nell'area di invasione neoplastica attiva sia più irregolare, meno organizzato e scarsamente funzionale.

A sua volta, in tutte e tre le porzioni stromali analizzate, la dimensione frattale è positivamente associata al volume percentuale di collagene (stroma: $\rho=0,822$; $P<0,0005$; fronte: $\rho=0,861$; $P<0,0005$; tumore: $\rho=0,937$; $P<0,0005$). Infatti, fibre disposte in modo ricorsivo tendono ad occupare un volume tridimensionale maggiore. Inoltre, la dimensione frattale è positivamente associata alla densità connettivale, (stroma: $\rho=0,714$; $P<0,0005$; fronte: $\rho=0,839$; $P<0,0005$; tumore: $\rho=0,874$; $P<0,0005$), ad indicare come tali fibre siano anche maggiormente connesse fra loro e densamente impacchettate. Un'associazione positiva emerge anche fra la densità connettivale ed il volume di collagene (stroma: $\rho=0,699$; $P<0,0005$; fronte: $\rho=0,848$; $P<0,0005$; tumore: $\rho=0,8897$; $P<0,0005$). La forza di associazione dei parametri tende ad aumentare avvicinandoci alla massa neoplastica; tuttavia, data la limitata dimensione campionaria non è possibile indagare ulteriormente la significatività di tale tendenza.

I dati relativi all'analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra i valori degli indici strutturali sono rappresentati nelle Figure 47, 48 e 49 e nelle Tabelle 22, 23 e 24, rispettivamente per stroma extratumorale, intratumorale e fronte infiltrativo.

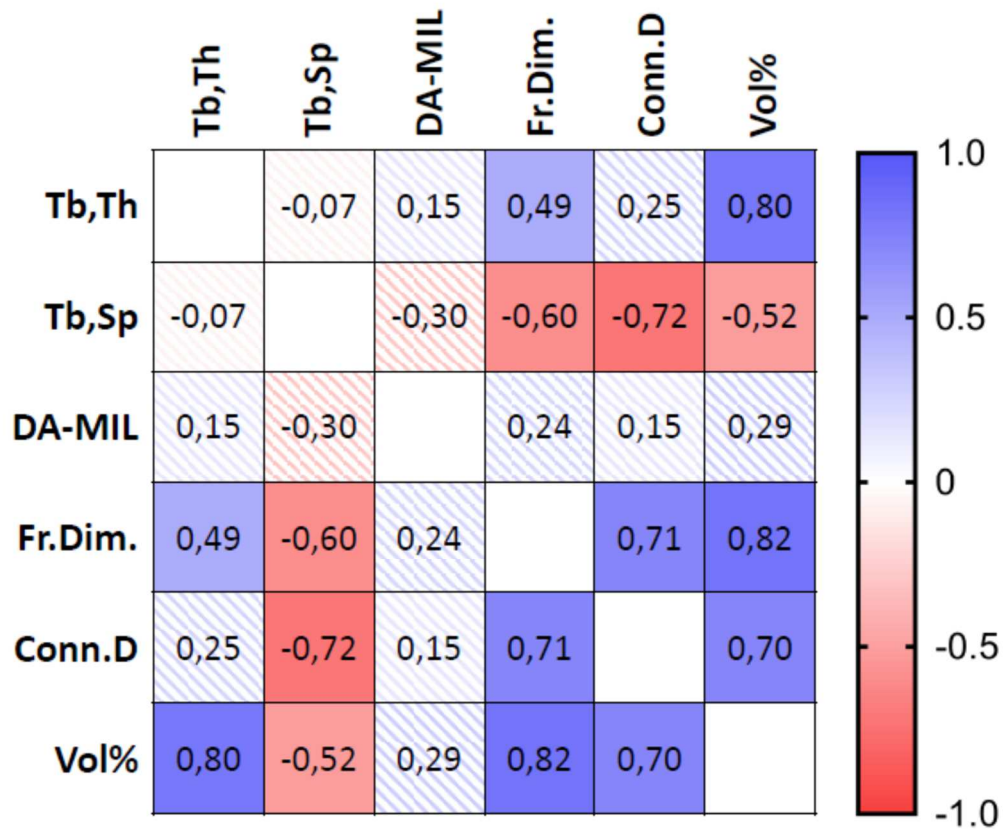


Figura 47. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra gli indici strutturali acquisiti nello stroma extratumorale (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale).

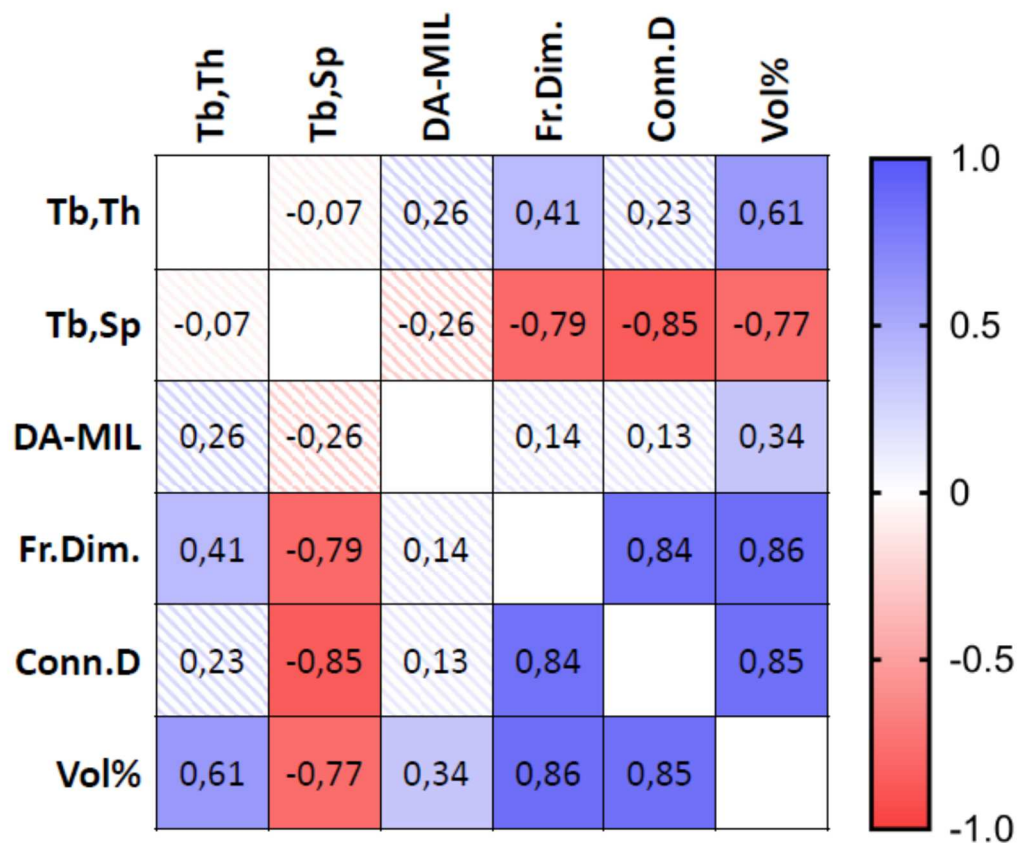


Figura 48. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra gli indici strutturali acquisiti nel fronte infiltrativo del tumore (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale).

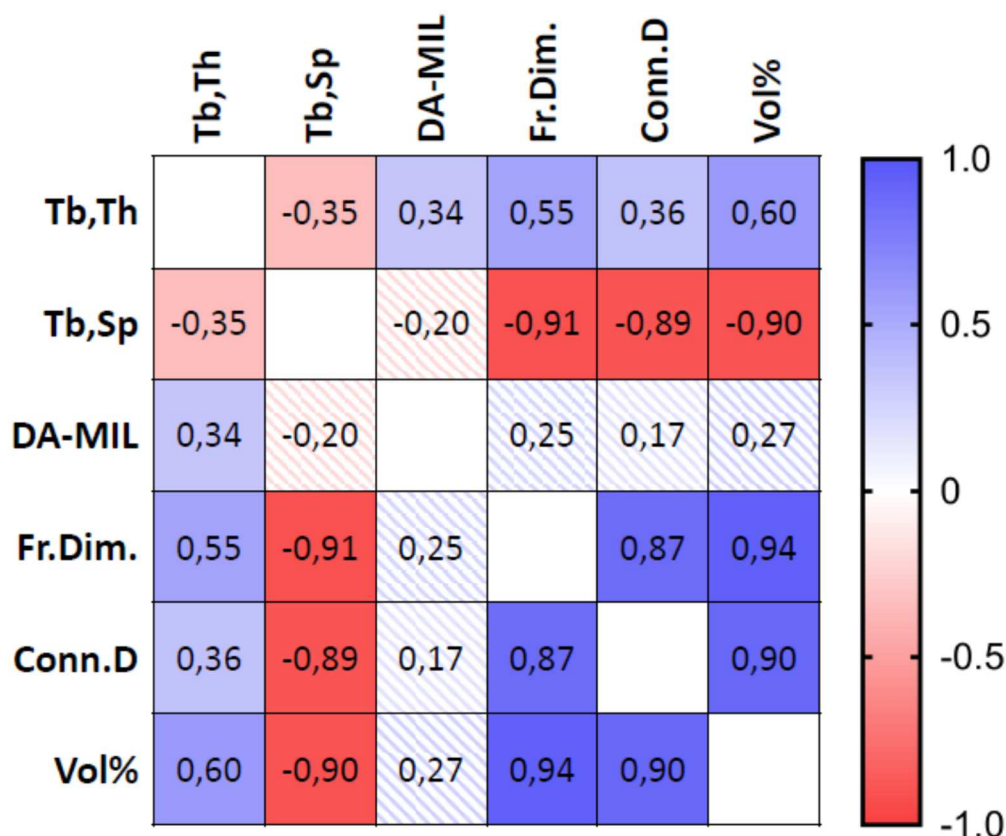


Figura 49. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra gli indici strutturali acquisiti nello stroma intratumorale (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale).

6.7. ANALISI DI CORRELAZIONE FRA GLI INDICI STRUTTURALI DELLO STROMA E LE CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEI CASI

Dall'analisi di correlazione fra gli indici strutturali e le caratteristiche clinico-patologiche dei campioni, condotta mediante il test R per ranghi di Spearman, emerge come lo spessore delle fibre collagene sia negativamente correlato allo stato linfonodale ed allo stadio patologico, sia nello stroma extratumorale (pN: $\rho=-0,494$; $P=0,003$; Stadio: $\rho=-0,359$; $P=0,034$), sia in prossimità del fronte infiltrativo (pN: $\rho=-0,529$; $P=0,001$; Stadio: $\rho=-0,357$; $P=0,035$). Pertanto, fibre più sottili sono state rilevate in campioni con maggior coinvolgimento linfonodale e in stadio patologico avanzato. Infatti, fibre collagene più spesse sono riconducibili a collagene maturo e fisiologico, mentre cambiamenti patologici inducono il contestuale aumento di collagene immaturo, tipicamente costituito da sottili fibrille, scarsamente connesse e orientate casualmente.

Inoltre, a livello extratumorale, lo spessore delle fibre correla inversamente con l'immunofenotipo ($\rho=-0,359$; $P=0,034$) e la distanza inter-fibrillare si associa negativamente alle dimensioni del

tumore primitivo (pT) ($\rho=-0,385$; $P=0,022$). In particolare, fibre più spesse caratterizzano tumori con fenotipo immuno-infiammato in cui il microambiente locale immunosoppressivo agisce dinamicamente contro la proliferazione neoplastica, mentre fibrille sottili prevalgono in tumori che risultano privi di cellule immunitarie sia nel parenchima sia nello stroma tumorale. Infine, un volume percentuale di collagene più elevato è stato riscontrato nello stroma extratumorale di casi con coinvolgimento linfonodale ($\rho=-0,370$; $P=0,029$) e nello stroma intratumorale di casi con elevato numero di TB ($\rho=0,344$; $P=0,043$). Pertanto, una maggior quota di collagene disperso nella massa tumorale centrale potrebbe determinare il raggruppamento delle cellule epiteliali neoplastiche in piccoli nidi od in cellule singole che caratterizzano neoplasie dal pattern infiltrativo avanzato. I risultati delle analisi di correlazione fra indici strutturali e le caratteristiche clinico-patologiche dei campioni sono rappresentati nelle Tabelle 22, 23 e 24, rispettivamente per lo stroma extratumorale, intratumorale e fronte infiltrativo.

Valutando le correlazioni che intercorrono fra i parametri morfologici caratteristici dello stroma tumorale (TB, TSR ed immunofenotipo) emerge come il numero di buds tumorali ed il TSR siano positivamente correlati con la modalità di invasione tumorale, in tutti e tre i compartimenti stromali analizzati. In particolare, casi con PPOI e WPOI più avanzato sono caratterizzati da un maggior numero di TB e una maggior percentuale di stroma tumorale, corroborando i risultati ottenuti dall'analisi di microscopia ottica.

	Tb,Th	Tb,Sp	DA-MIL	Fr.Dim	Conn.D	Vol.%	Età	Sesso	WPOI	TB	PPOI	pT	pN	Stadio	TSR	Immuno fenotipo
Tb,Th	$\rho = 1$	-0,069	0,148	0,490	0,255	0,799	0,087	-0,080	0,099	0,168	0,077	-0,278	-0,494	-0,359	-0,090	-0,359
	P = 1	0,696	0,396	0,003	0,139	0,000	0,621	0,646	0,572	0,336	0,662	0,105	0,003	0,034	0,606	0,034
Tb,Sp	$\rho = 1$	-0,296	-0,596	-0,720	-0,517	0,199	0,107	0,009	-0,045	0,028	-0,385	-0,116	-0,111	0,041	0,128	
	P = 1	0,084	0,000	0,000	0,001	0,253	0,540	0,957	0,795	0,872	0,022	0,506	0,525	0,814	0,465	
DA-MIL	$\rho = 1$		0,243	0,146	0,293	-0,158	<u>-0,322</u>	0,174	-0,012	0,097	0,095	0,266	0,228	-0,165	-0,145	
	P = 1		0,159	0,404	0,087	0,364	<u>0,059</u>	0,316	0,946	0,577	0,587	0,122	0,187	0,343	0,405	
Fr.Dim.	$\rho = 1$			0,714	0,822	-0,072	-0,152	-0,083	0,052	-0,079	0,032	-0,120	0,012	-0,191	-0,186	
	P = 1			0,000	0,000	0,680	0,383	0,634	0,765	0,650	0,856	0,491	0,945	0,273	0,285	
Conn.D	$\rho = 1$				0,699	0,056	-0,203	0,027	0,125	-0,046	0,152	-0,122	-0,001	-0,077	-0,029	
	P = 1				0,000	0,748	0,243	0,879	0,474	0,793	0,383	0,486	0,997	0,660	0,870	
Vol.%	$\rho = 1$					0,034	-0,155	0,065	0,090	0,030	-0,087	-0,370	-0,211	-0,137	-0,250	
	P = 1					0,847	0,374	0,711	0,606	0,864	0,618	0,029	0,223	0,433	0,147	
Età	$\rho = 1$						-0,048	0,029	0,038	0,189	-0,038	-0,112	-0,044	-0,015	<u>0,323</u>	
	P = 1						0,785	0,867	0,827	0,277	0,829	0,521	0,802	0,934	<u>0,059</u>	
Sesso	$\rho = 1$							-0,300	-0,108	-0,421	<u>-0,331</u>	-0,145	-0,250	0,176	0,052	
	P = 1							0,080	0,537	0,012	<u>0,052</u>	0,405	0,148	0,311	0,765	
WPOI									$\rho = 1$	0,551	0,847	0,265	0,260	0,215	0,359	0,213

	P = 1	0,001	0,000	0,124	0,131	0,214	0,034	0,218
TB	$\rho = 1$	0,445		0,182	0,202	0,216	<u>0,310</u>	0,072
	P = 1	0,007		0,295	0,245	0,213	<u>0,070</u>	0,680
PPOI	$\rho = 1$	0,390		0,166	0,111		0,397	0,268
	P = 1	0,021		0,341	0,524		0,018	0,119
pT	$\rho = 1$	0,340	0,426				<u>0,288</u>	0,155
	P = 1	0,046	0,011				<u>0,093</u>	0,374
pN	$\rho = 1$					0,863	0,097	0,145
	P = 1					0,000	0,580	0,406
Stadio	$\rho = 1$						0,032	0,130
	P = 1						0,854	0,455
TSR	$\rho = 1$							0,262
	P = 1							0,128
Immuno fenotipo								$\rho = 1$
								P = 1

Tabella 22. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra indici strutturali e le caratteristiche clinico patologiche dello stroma extratumorale (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale; WPOI: pattern infiltrativo peggiore; TB: tumor budding; PPOI: pattern infiltrativo prevalente; TSR: tumor stroma ratio).

	Tb,Th	Tb,Sp	DA-MIL	Fr.Dim	Conn.D	Vol.%	Età	Sesso	WPOI	TB	PPOI	pT	pN	Stadio	TSR	Immuno fenotipo
Tb,Th	$\rho = 1$	-0,347	0,341	0,545	0,365	0,598	0,184	-0,095	0,243	0,245	0,264	-0,162	0,054	0,110	0,299	0,018
	P = 1	0,041	0,045	0,001	0,031	0,000	0,291	0,586	0,159	0,156	0,125	0,354	0,758	0,531	0,081	0,919
Tb,Sp	$\rho = 1$	-0,197	-0,911	-0,894	-0,901	-0,078	-0,107	-0,182	-0,236	-0,071	-0,029	0,056	-0,049	-0,317	0,100	
	P = 1	0,258	0,000	0,000	0,000	0,656	0,540	0,295	0,172	0,683	0,867	0,749	0,780	0,064	0,568	
DA-MIL	$\rho = 1$		0,246	0,170	0,274	-0,188	0,060	-0,075	-0,045	-0,113	-0,262	-0,060	-0,163	0,065	-0,201	
	P = 1		0,154	0,330	0,111	0,280	0,734	0,668	0,795	0,519	0,128	0,732	0,349	0,712	0,247	
Fr.Dim.	$\rho = 1$			0,874	0,937	0,124	0,006	0,232	0,255	0,203	0,044	0,019	0,105	<u>0,311</u>	-0,092	
	P = 1			0,000	0,000	0,477	0,973	0,179	0,139	0,242	0,802	0,913	0,547	<u>0,069</u>	0,598	
Conn.D	$\rho = 1$				0,897	0,033	0,067	0,191	0,230	0,099	0,137	-0,029	0,086	0,263	-0,008	
	P = 1				0,000	0,851	0,701	0,271	0,185	0,573	0,433	0,867	0,622	0,127	0,965	
Vol.%	$\rho = 1$					0,058	-0,083	<u>0,320</u>	0,344	0,260	0,042	0,000	0,116	<u>0,318</u>	-0,057	
	P = 1					0,741	0,634	<u>0,061</u>	0,043	0,131	0,810	1,000	0,508	<u>0,062</u>	0,744	
Età	$\rho = 1$					-0,048	0,029	0,038	0,189	-0,038	-0,112	-0,044	-0,015	-0,112		
	P = 1					0,785	0,867	0,827	0,277	0,829	0,521	0,802	0,934	0,521		
Sesso	$\rho = 1$					-0,300	-0,108	-0,421	<u>-0,331</u>	-0,145	-0,250	0,176	-0,145			
	P = 1					0,080	0,537	0,012	<u>0,052</u>	0,405	0,148	0,311	0,405			
WPOI								$\rho = 1$	0,551	0,847	0,265	0,260	0,215	0,359	0,213	

	P = 1	0,001	0,000	0,124	0,131	0,214	0,034	0,218
TB	$\rho = 1$	0,445		0,182	0,202	0,216	<u>0,310</u>	0,072
	P = 1	0,007		0,295	0,245	0,213	<u>0,070</u>	0,680
PPOI	$\rho = 1$	0,390		0,166	0,111		0,397	0,268
	P = 1	0,021		0,341	0,524		0,018	0,119
pT	$\rho = 1$	0,340	0,426				0,288	0,155
	P = 1	0,046	0,011				0,093	0,374
pN	$\rho = 1$					0,863	0,097	0,145
	P = 1					0,000	0,580	0,406
Stadio	$\rho = 1$						0,032	0,130
	P = 1						0,854	0,455
TSR	$\rho = 1$							0,262
	P = 1							0,168
Immuno fenotipo								$\rho = 1$
								P = 1

Tabella 23. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra indici strutturali e le caratteristiche clinico patologiche dello stroma intratumorale (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale; WPOI: pattern infiltrativo peggiore; TB: tumor budding; PPOI: pattern infiltrativo prevalente; TSR: tumor stroma ratio).

	Tb,Th	Tb,Sp	DA-MIL	Fr.Dim	Conn.D	Vol.%	Età	Sesso	WPOI	TB	PPOI	pT	pN	Stadio	TSR	Immuno fenotipo
Tb,Th	$\rho = 1$	-0,072	0,261	0,405	0,228	0,606	<u>0,308</u>	-0,131	0,032	0,009	0,138	-0,261	-0,529	-0,357	-0,107	-0,180
	P = 1	0,680	0,130	0,016	0,187	0,000	<u>0,072</u>	0,453	0,855	0,960	0,428	0,130	0,001	0,035	0,542	0,300
Tb,Sp	$\rho = 1$	-0,258	-0,790	-0,854	-0,769	-0,119	-0,125	0,062	-0,139	0,010	-0,044	-0,179	-0,228	-0,224	0,007	
	P = 1	0,135	0,000	0,000	0,000	0,497	0,474	0,724	0,425	0,953	0,803	0,304	0,187	0,196	0,970	
DA-MIL	$\rho = 1$	0,135	0,126	0,335	0,085	0,036	0,125	0,110	0,040	-0,059	0,239	0,178	-0,041	-0,078		
	P = 1	0,438	0,470	0,049	0,629	0,838	0,473	0,530	0,820	0,735	0,166	0,305	0,816	0,654		
Fr.Dim.	$\rho = 1$	0,839	0,861	0,192	0,221	-0,139	0,036	-0,066	-0,111	<u>-0,305</u>	-0,235	0,116	-0,036			
	P = 1	0,000	0,000	0,270	0,203	0,427	0,837	0,706	0,526	<u>0,075</u>	0,175	0,508	0,836			
Conn.D	$\rho = 1$	0,848	0,193	0,101	-0,130	-0,054	-0,091	0,005	0,052	0,153	0,164	0,133				
	P = 1	0,000	0,265	0,562	0,455	0,758	0,602	0,977	0,767	0,380	0,347	0,446				
Vol.%	$\rho = 1$	0,299	0,006	-0,042	0,090	0,050	-0,053	-0,156	0,002	0,126	-0,058					
	P = 1	0,081	0,973	0,812	0,608	0,775	0,761	0,372	0,989	0,470	0,741					
Età	$\rho = 1$	-0,048	0,029	0,038	0,189	-0,038	-0,112	-0,044	-0,015	-0,112						
	P = 1	0,785	0,867	0,827	0,277	0,829	0,521	0,802	0,934	0,521						
Sesso	$\rho = 1$	-0,300	-0,108	-0,421	<u>-0,331</u>	-0,145	-0,250	0,176	-0,145							
	P = 1	0,080	0,537	0,012	<u>0,052</u>	0,405	0,148	0,311	0,405							
WPOI	$\rho = 1$	0,551	0,847	0,265	0,260	0,215	0,359	0,213								

	P = 1	0,001	0,000	0,124	0,131	0,214	0,034	0,218
TB	$\rho = 1$	0,445		0,182	0,202	0,216	<u>0,310</u>	0,072
	P = 1	0,007		0,295	0,245	0,213	<u>0,070</u>	0,680
PPOI	$\rho = 1$	0,390		0,166	0,111		0,397	0,268
	P = 1	0,021		0,341	0,524		0,018	0,119
pT	$\rho = 1$	0,340	0,426				0,288	0,155
	P = 1	0,046	0,011				0,093	0,374
pN	$\rho = 1$					0,863	0,097	0,145
	P = 1					0,000	0,580	0,406
Stadio	$\rho = 1$						0,032	0,130
	P = 1						0,854	0,455
TSR	$\rho = 1$							0,262
	P = 1							0,168
Immuno fenotipo								$\rho = 1$
								P = 1

Tabella 24. Analisi di correlazione R per ranghi di Spearman fra indici strutturali e le caratteristiche clinico patologiche del fronte infiltrativo (Tb, Th: spessore delle fibre collagene; Tb, Sp: distanza fra le fibre collagene; DA-MIL: grado di anisotropia; Fr.Dim: dimensione frattale; Conn.D: densità connettivale; Vol%: volume percentuale; WPOI: pattern infiltrativo peggiore; TB: tumor budding; PPOI: pattern infiltrativo prevalente; TSR: tumor stroma ratio).

7. DISCUSSIONE

Nonostante il ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica sia stato riconosciuto da oltre un decennio in differenti tipologie di tumori solidi, le principali caratteristiche istopatologiche del carcinoma orale valutate nella diagnostica patologica di routine sono limitate al compartimento epiteliale. Inoltre, sebbene siano state apportate significative integrazioni alla stadiazione patologica del Cancer Staging Manual (AJCC), la sopravvivenza a breve termine dei pazienti affetti da carcinoma orale è piuttosto scarsa ed i protocolli terapeutici non garantiscono un'efficacia favorevole a medio-lungo termine. Ancora, mancano validi marcatori prognostici capaci di stratificare i gruppi di rischio che possano guidare le scelte clinico-terapeutiche.

Il tessuto stromale rappresenta il principale componente del microambiente tumorale, la cui crescita predice esiti clinici di malattia sfavorevoli, e le costanti interazioni fra il compartimento stromale ed epiteliale condizionano considerevolmente sia lo sviluppo sia la progressione neoplastica. Esso è composto principalmente da cellule non maligne associate al tumore immerse nella sostanza fondamentale costituita prevalentemente da fibre collagene. Sebbene nessuna cellula sia maligna di per sé, il microambiente tumorale favorisce la possibilità di acquisizione di un fenotipo anomalo che può risultare in alterazioni permanenti della funzionalità cellulare, dato che vengono deposte elevate quantità di collagene e rilasciati elevati livelli di enzimi proteolitici e di fattori di crescita neo-angiogenetici e pro-fibrotici, direttamente coinvolti nello sviluppo di proprietà invasive. Pertanto, l'analisi morfologica dello stroma tumorale e delle fibre collagene risulta cruciale per comprendere gli eventi biologici coinvolti nella tumorigenesi orale.

Il tumor-stroma ratio è stato definito come il rapporto tra la quota di cellule epiteliali neoplastiche e la quota di stroma associato al tumore ed un numero crescente di studi ha correlato la presenza di un'elevata quantità di stroma ad esiti clinici di malattia sfavorevoli, specie nei carcinomi del colon [171], dell'esofago [181], del nasofaringe [139] e della laringe [140-142], così come in pazienti affetti da carcinoma orale. Uno studio pilota condotto su una piccola coorte di pazienti affetti da OSCC ha dimostrato la presenza di correlazioni significative fra tumori ricchi di stroma e caratteristiche istopatologiche avverse. In particolare, un pattern di invasione infiltrativo (POI 3 e POI 4) ed un DOI ad alto rischio (≥ 10 mm) sono stati osservati rispettivamente nel 78,0% ($P=0,007$) e nel 61,1% ($P=0,000$) dei casi con TSR basso [137]. Anche la presenza di PNI è risultata significativamente maggiore negli OSCC ($P < 0,00001$) [134] e negli OTSCC ($P=0,04$) [133] con elevata percentuale di stroma. Al contrario, pazienti con scarso stroma sono stati caratterizzati da aspetti istopatologici favorevoli, risultando negativi sia per la presenza di invasione perineurale (83,3%; $P < 0,005$) e linfovaskolare (88,1%; $P < 0,005$), sia per il superamento della capsula linfonodale extranodale (78,6%; $P=0,02$) [137].

Inoltre, un'elevata percentuale stromale è stata correlata ad abitudini tabagiche ($P=0,04$) e al sito di localizzazione linguale e del pavimento orale ($P=0,002$) [136]. Solamente un Autore non ha riscontrato alcuna associazione significativa fra la percentuale di stroma tumorale ed i fattori di rischio avversi del carcinoma orale, anche analizzando neoplasie della lingua di per sé [182].

Considerando gli outcome clinici, il rischio di recidiva locoregionale dei pazienti con alta percentuale di stroma è risultato fino a 2 volte più elevato rispetto a quello di soggetti con alto TSR ($HR=2,11$; 95% CI 1,56-2,86; $P<0,001$) [136-138]; risultati osservati anche in campioni di OSCC ($HR=4,73$; 95% CI 1,75-12,77; $P=0,002$) [136] e OTSCC iniziali ($HR=1,81$; 95% CI 1,17-2,79; $P=0,008$) [133]. Inoltre, OSCC precoci e con basso TSR hanno mostrato una probabilità quadruplicata di metastasi cervicali occulte alla presentazione clinica iniziale ($HR=4,399$; 95% CI 1,445-13,391; $P=0,009$) [134]. Stratificando i campioni in base al grado di differenziazione istologica, il TSR ha dimostrato una miglior capacità predittiva in tumori ben differenziati (DFS: $HR=4,38$; 95% CI 2,14-8,95; $P<0,001$; DSS: $HR=4,75$; 95% CI 1,93-11,68; $P=0,001$) e moderatamente differenziati (DFS: $HR=1,59$; 95% CI 1,07-2,35; $P=0,021$; DSS: $HR=2,46$; 95% CI 1,53-3,97; $P<0,001$), piuttosto che in campioni scarsamente differenziati (DFS: $HR=2,25$; 95% CI 1,04-4,84; $P=0,039$; DSS: $HR=1,59$; 95% CI 0,69-3,67; $P=0,274$) [138].

Tali dati trovano conferma nei risultati del presente studio, da cui si evince come il punteggio del TSR influenzi notevolmente le aspettative di vita dei pazienti (DSS: $HR=1,883$; 95% CI 1,033-3,432; $P=0,039$; OS: $HR=1,747$; 95% CI 0,967-3,154; $P=0,044$). Inoltre, il nomogramma ha permesso di stimare con elevati livelli di performance predittiva (sensibilità: 83,6%; specificità 76,8%) i tassi di mortalità correlata al cancro, sia ad 1 anno, sia a 3 anni, che a 5 anni dal trattamento chirurgico iniziale, garantendo una buona stratificazione dei pazienti nei differenti gruppi prognostici utilizzando uno score totale di categorizzazione pari a 15,03 [111]. In letteratura, casi con TSR scarso hanno mostrato un rischio triplicato di mortalità associata al cancro ($HR=3,58$; 95% CI 2,05-6,27; $P<0,00001$) [136] e di sopravvivenza globale ($HR=2,54$; 95% CI 1,78-3,64; $P<0,0001$) [138], rispetto al gruppo con alto TSR [138]. Questi dati risultano ancor più significativi considerando stadi precoci di malattia (DSS: $HR=7,223$; 95% CI 2,039-25,591; $P=0,002$) [134], e valutando separatamente casi localizzati in sede linguale [111, 133, 138], come corroborato dai risultati di due recenti revisioni sistematiche della letteratura [135, 183]. Combinando il punteggio del TSR e del TB, il modello di rischio proposto da Dourado et al. è risultato fattore predittivo indipendente di scarsa DSS e DFS in un'ampia corte di OSCC. In particolare, sia il gruppo a rischio intermedio ($HR=2,15$; 95% CI 1,05-4,39; $P=0,03$) che alto ($HR=2,62$; 95% CI 1,76-3,91; $P<0,0001$) hanno mostrato una DSS notevolmente inferiore rispetto ai pazienti a basso rischio, mentre solo i pazienti ad alto rischio hanno presentato una probabilità maggiore di recidiva locoregionale (40,1% vs 79,0%). Tali dati sono emersi anche stratificando i casi per stadio patologico.

Negli OSCC iniziali, i casi ad alto rischio hanno registrato una probabilità di decesso per malattia quasi quadruplicata (HR=3,70; 95% CI 1,99-6,88; P<0,0001) e un rischio di recidiva locoregionale quasi raddoppiato rispetto ai pazienti a rischio basso (HR=1,89; 95% CI 1,16-3,10; P=0,01). Negli stadi avanzati invece il gruppo di rischio ha condizionato esclusivamente la DSS. Secondo gli Autori, la prognosi scarsa dei pazienti con alta percentuale di stroma tumorale potrebbe essere attribuita all'interazione fra le cellule tumorali neoplastiche e i CAF, capaci di produrre una grande quantità di ECM e di collagene. Il collagene e i peptidi da esso derivati, prodotti durante la maturazione delle fibre collagene o dalla degradazione proteolitica della matrice, sarebbero direttamente correlati con la capacità proliferativa e migratoria delle cellule tumorali neoplastiche ed in grado di influenzare l'attività angiogenetica e immunitaria del microambiente tumorale [136]. A sostegno di tale ipotesi, il valore predittivo del TSR è risultato ancora più elevato e discriminativo una volta integrato nel BD model, data la combinazione dei due parametri prognostici che riflettono le caratteristiche dello stroma tumorale (TSR) e dell'epitelio neoplastico (TB). Pazienti ad alto rischio hanno mostrato una probabilità di recidiva triplicata (HR=3,42; 95% CI 1,71-6,82; P=0,004) ed un rischio di mortalità correlata al cancro oltre 11 volte superiore (HR=11,63; 95% CI 3,83-35,31; P<0,001) rispetto ai casi a basso rischio. Pertanto, gli OTSCC iniziali a rischio alto potrebbero beneficiare di un approccio terapeutico multimodale che preveda la resezione chirurgica del tumore primario e la dissezione profilattica dei linfonodi del collo con la possibilità di una terapia radioterapica adiuvante [133].

La possibilità di implementare il punteggio del TSR nella pratica clinica è supportata dall'elevata riproducibilità di valutazione su vetrini colorati con ematossilina-eosina, come dimostrano dagli ottimi valori di Kappa di Cohen riportati in letteratura (0,906-0,946) [134-138], in linea con quelli calcolati nel presente studio, sia considerando il TSR come una variabile continua, sia come una variabile categoriale (0,807) [111]. In particolare, applicando un cut-off pari al 50%, la concordanza inter-osservatore è quasi perfetta e l'effetto confondente, dato dall'eterogeneità del fronte infiltrativo tumorale, si riduce considerevolmente [101, 134]. Tuttavia, casi con score variabile dal 40% al 60% potrebbero essere influenzati dalla presenza di un fronte infiltrativo eterogeneo, con conseguente rischio di interpretare erroneamente un tumore povero di stroma per uno con elevata quantità stromale. Pertanto, laddove possibile, è consigliabile selezionare solamente aree ricche di stroma che non comprendano tessuto muscolare e ghiandolare, grandi fibre nervose e grandi vasi sanguigni e tessuto necrotico, più difficile negli stadi avanzati di malattia specie localizzati in sede linguale. Tuttavia, i recenti progressi nelle metodiche di imaging del distretto testa-collo potrebbero essere sfruttati proprio per stimare accuratamente il TSR attraverso l'analisi di eterogeneità intratumorale [184].

Recentemente il trattamento delle lesioni neoplastiche ha subito un notevole miglioramento con l'introduzione dell'immunoterapia. Questa particolare strategia terapeutica ha come obiettivo quello di restaurare una preesistente risposta immunitaria antitumorale dell'ospite, inibita dallo sviluppo di un microambiente locale immunosoppressivo da parte del tumore stesso. Essa agisce dinamicamente, sfruttando e potenziando la risposta immunitaria diretta contro le cellule tumorali piuttosto che mirare a distruggerle direttamente. Tra i vari approcci immunoterapici quelli volti al blocco del checkpoint immunitario rappresentano le strategie attualmente più promettenti. Tale blocco si traduce in una riattivazione delle cellule T e un aumento della risposta antitumorale. Tuttavia, soltanto una minoranza di pazienti affetti da tumori solidi mostra esiti clinici favorevoli, a causa della estrema complessità del microambiente tumorale di tali neoplasie. Infatti, le cellule immunitarie svolgono ruoli differenti in base al tipo di cancro ed alla localizzazione nel tumore stesso. I TIL sono i principali componenti del microambiente immunitario e possono invadere il parenchima e/o lo stroma tumorale. La loro organizzazione spaziale in relazione alle cellule epiteliali neoplastiche ha destato notevole interesse, tanto che sono stati proposti diversi metodi di categorizzazione immunofenotipica dei tumori solidi proprio in base alla loro distribuzione. Il numero di fenotipi immunitari è variabile da due a più di quattro in base ai criteri adottati per la classificazione topografica del tumore. Ad ogni modo, tutte le classificazioni prevedono l'esistenza di un fenotipo caratterizzato dall'assenza di cellule immunitarie sia nel parenchima sia nello stroma tumorale definito come "deserto", "silente" o "freddo" (*cold tumor*). La mancanza o la scarsità di infiltrazione linfocitaria tumorale potrebbe essere dovuta al mancato reclutamento di cellule presentanti l'antigene (APC), alla mancata attivazione o migrazione dei linfociti T nei tessuti tumorali o all'alterata produzione di citochine e fattori pro-infiammatori. Indipendentemente dalla causa, l'evidenza scientifica sembra suggerire che i tumori "freddi" siano caratterizzati da prognosi scarsa, come confermano i risultati del presente studio che sostengono la mancanza di un'efficace risposta immunitaria antitumorale capace di limitare la crescita neoplastica e la disseminazione locoregionale in pazienti affetti da OTSCC con fenotipo immuno-deserto. Questo sottogruppo di pazienti ha mostrato esiti clinici di malattia sfavorevoli, sia in termini di mortalità correlata al cancro (HR=2,280; 95% CI 1,107-4,696; P=0,025), sia di sopravvivenza globale (HR=2,299; 95% CI 1,115-4,742; P=0,024), tanto che il fenotipo immuno-deserto è risultato il miglior predittore negativo di scarsa sopravvivenza. Anche il fenotipo immuno-escluso è risultato fattore predittivo negativo, sebbene abbia mostrato un potere prognostico inferiore rispetto all'immunofenotipo deserto (HR=1,70; 95% CI 0,98-2,96; P=0,059). Questo dato corrobora l'ipotesi secondo cui l'immunofenotipo escluso sia indice della presenza di un infiltrato immunitario che non riesce ad esplicare a pieno la sua attività antitumorale, rimanendo confinato esclusivamente nello stroma tumorale [167].

Tali risultati sono in accordo con quelli recentemente pubblicati da Heikkinen et al. in uno studio multicentrico condotto su pazienti affetti da OTSCC in stadio iniziale. Gli Autori hanno dimostrato che una percentuale di TIL >20% nello stroma tumorale predice efficacemente esiti clinici di malattia favorevoli, sia in termini di sopravvivenza globale (HR=2,61; 95% CI 1,77-3,83; P<0,0001), sia di mortalità correlata al cancro (HR=1,99; 95% CI 1,07-3,69; P=0,040), che di rischio di recidiva locoregionale (HR=1,94; 95% CI 1,14-3,29; P=0,020), mentre i livelli di TIL intratumorali non sembrano influenzare la sopravvivenza dei pazienti [166].

In riferimento alla classificazione proposta da Chen e Melman, è stato sottolineato come la distinzione tra il fenotipo immuno-infiammato ed immuno-escluso non sia chiaramente definita, dato che nello stesso campione è possibile osservare un continuum di valori relativi al grado di infiltrazione immunitaria. Questa osservazione è dovuta alla continua evoluzione dell'infiltrato infiammatorio nel tessuto tumorale, determinata dal reciproco cross talk fra cellule neoplastiche e il microambiente immunitario. Pertanto, l'immunofenotipo rappresenta la mera descrizione statica di un fenomeno estremamente complesso e dinamico. Inoltre, la densità dei linfociti T all'interno e all'esterno del tumore può ostacolare una chiara classificazione del campione, compromettendo la stratificazione prognostica dei pazienti. Tuttavia, applicando le raccomandazioni del International TILs Working Group, la concordanza inter-osservatore (0,886) è risultata ottima [167]. Ancora, rispetto ai fenotipi individuati da Chen e Melman, tutti i casi classificati da Li et al., come profilo immunitario IS3 appartengono al fenotipo "non-immune" e la maggior parte (91%) di quelli con profilo IS4 appartengono alla classe con fenotipo "immuno-attivo". Il profilo IS3 è caratterizzato da una minor espressione di molecole infiammatorie, specie di INF- γ , una minor quota leucocitaria e linfocitaria e una ridotta frazione stromale, indicando un fenotipo immunitario "freddo", correlato a prognosi peggiore, indipendentemente dalla sede del carcinoma, dallo stadio patologico, dall'età del soggetto e dallo status di infezione da HPV. Al contrario, il fenotipo IS4 ha mostrato una maggior quota di cellule T e maggiori livelli di espressione di INF- γ , una più alta attività citolitica locale, un elevato rapporto fra macrofagi M1/M2 ed uno stroma tumorale poco reattivo, suggerendo un fenotipo immuno-attivato, ovvero la presenza di un microambiente immunitario antitumorale preesistente, associato a prognosi favorevole [185].

Solamente due metanalisi hanno valutato il ruolo prognostico dei TIL nella tumorigenesi del carcinoma orale. Huang et al. hanno osservato come un'elevata infiltrazione di TIL, senza differenziazione per sub-tipo e sub-localizzazione, non sia significativamente associata alla prognosi dei carcinomi orali. Tuttavia, analizzando la composizione e la localizzazione dell'infiltrato infiammatorio nel microambiente tumorale, gli Autori hanno dimostrato come la presenza di macrofagi CD163+ e CD68+ nello stroma tumorale sia significativamente associata a prognosi scarsa, sia in termini di sopravvivenza globale (CD68: HR=1,44; 95% IC 1,15-1,81;

P=0,001; CD163: HR=2,48; 95% IC 2,00-3,08; P<0,00001), sia in termini di disseminazione locoregionale (CD68: HR=1,82; 95% IC 1,34-2,48; P=0,0001; CD163: HR=2,08; 95% IC 1,18-3,68; P=0,01) [161]. Tali risultati sono stati ottenuti anche da altri gruppi di ricerca [161, 163, 185-187]; tuttavia, il ruolo prognostico dei macrofagi CD68+ negli OSCC è alquanto controverso. Infatti, altri Autori non hanno rilevato alcuna correlazione fra la densità dei macrofagi CD68+ e gli esiti clinici di malattia [162, 188], probabilmente a causa delle differenti funzioni delle sub-popolazioni macrofagiche. Infatti, il marker CD68 viene espresso sia dai macrofagi pro-infiammatori (M1), che stimolano la risposta immunitaria T helper (Th) 1, sia da quelli con attività antinfiammatoria (M2), che promuovono la crescita tumorale. Inoltre, di recente è stata suggerita la presenza di un continuum di fenotipi macrofagici fra quello M1 "puro" ed il profilo M2, con la possibilità delle cellule di essere reindirizzate ad un fenotipo o ad un altro. Pertanto, il CD163 rappresenterebbe un marker prognostico più affidabile nell'OSCC rispetto al CD68.

Analogamente, anche il ruolo prognostico dei linfociti CD4+ nel carcinoma orale risulta controverso. Fang et al., non hanno dimostrato alcuna relazione significativa fra l'infiltrazione dei linfociti CD4+ e la prognosi dei pazienti affetti da OSCC (P=0,909) [162], mentre nello studio di Nguyen et al., condotto su carcinomi della testa e del collo, elevati livelli di CD4+ hanno predetto una OS (HR=0,77; 95% IC 0,65-0,93; P=0,005) ed una DSS (HR=0,77; 95% IC 0,64-0,94; P=0,008) migliore [189]. A seconda degli stimoli, i linfociti CD4+ possono differenziarsi in una serie di sub-popolazioni, ognuna caratterizzata dal rilascio di specifiche citochine e chemochine che modulano funzioni distinte. In particolare, i Th1, attivati dall'INF- α/β e dall'IL-12, assistono l'azione citotossica dei linfociti CD8+, mentre i Th2 ed i T regolatori (Treg) regolano negativamente l'immunità adattativa promuovendo la differenziazione dei macrofagi M2 o inibendo la proliferazione delle cellule T effettrici. Solitamente i linfociti Th17 promuovono una risposta immunitaria antitumorale protettiva, facilitando il reclutamento di ulteriori cellule immunitarie effettrici che collegano i linfociti T effettrici, le cellule Natural Killer (NK), le cellule dendritiche e le cellule effettrici citotossiche fra loro. Tuttavia, possono convertirsi in cellule regolatorie o in cellule helper follicolari in base al microambiente tumorale. Sia i linfociti Th17 che i Treg tendono ad accumularsi nel tumore nelle prime fasi della carcinogenesi, durante la proliferazione delle cellule neoplastiche; successivamente con il progredire della malattia gli infiltrati di Th17 diminuiscono gradualmente mentre quelli di Treg aumentano, tanto che un elevato rapporto Th17/Treg è risultato fattore prognostico indipendente di miglior sopravvivenza globale (HR=0,217; P=0,002) [164].

I dati relativi alle cellule T CD8+, le principali cellule T effettrici che stimolano la risposta immunitaria antitumorale, risultano più chiari. Un'elevata densità di CD8+ ha predetto esiti clinici di malattia favorevoli in pazienti affetti da OSCC. In particolare, cellule CD8+ localizzate nello

stroma tumorale (HR=0,51; 95% CI 0,39-0,66; P<0,0001) e all'interno della massa tumorale (HR=0,56; 95% CI 0,41-0,76; P=0,0002) predicono una miglior sopravvivenza globale, mentre quelli intratumorali sono indicativi di tempi di sopravvivenza specifica di malattia più elevati (HR=0,55; 95% CI 0,31-0,99; P=0,05) [161]. Il ruolo prognostico dei linfociti T CD8+ è stato convalidato da ulteriori studi [162, 163, 185, 187, 189-191], pertanto, questi potrebbero rappresentare potenti cellule T effettrici antitumorali. Tuttavia, alcuni Autori [164, 188] non sono stati in grado di rilevare alcuna variazione significativa dei livelli di CD8+ in campioni chirurgici di OSCC. Questo potrebbe essere attribuito alla segnalazione recettoriale del CTLA-4 e del PD-1 sulle cellule T CD8+, capaci di inibire la loro attività citotossica. Inoltre, la presenza di differenti istotipi tumorali e stadi clinici di malattia, i diversi sistemi di punteggio e le diverse tecniche di analisi e di caratterizzazione utilizzati per calcolare l'espressione dei TIL, possono influenzare i risultati [164]. Analogamente, un'elevata densità di infiltrazione di linfociti CD45RO+ (HR=0,62; 95% CI 0,47-0,83; P=0,001) e di cellule NK CD57+ (HR=0,32; 95% CI 0,11-1,00; P=0,05) ha influenzato positivamente la sopravvivenza globale [161]. I linfociti CD45RO+ sono cellule T della memoria che permangono per mesi dopo aver generato una risposta immunitaria e sono responsabili di una risposta immunitaria rapida ed amplificata dopo esposizione ad antigeni secondari. Pertanto, la loro infiltrazione potrebbe essere indicativa di un effetto antitumorale persistente. I dati di Hadler-Olsen et al. hanno confermato il ruolo prognostico dei macrofagi CD163+ e delle cellule NK CD57+, quali migliori predittori di sopravvivenza nei pazienti affetti da carcinoma orale [188]. Fang et al. hanno attribuito una maggior accuratezza prognostica proprio all'infiltrazione delle cellule NK CD57+ (AUC=0,868; 95% CI 0,785-0,950), correlata ad un tempo di sopravvivenza globale oltre sei volte maggiore rispetto a tumori scarsamente infiltrati (HR=6,576; 95% IC 2,768-15,623; P<0,0001) [162].

Alla luce di questi risultati pazienti con immunofenotipo favorevole potrebbero beneficiare di una terapia volta al blocco dei checkpoint immunitari per aumentare la risposta immunitaria preesistente, mentre in pazienti con altri fenotipi, una monoterapia risulterebbe insufficiente a causa dell'attivazione immunitaria subottimale o alla presenza di meccanismi immunitari soppressivi.

La quota di infiltrazione linfocitaria è stata anche studiata in relazione alla percentuale ed alla tipologia di stroma tumorale e alla presenza di TB per determinare modelli di rischio che possano definire la prognosi dei pazienti. Ad esempio, carcinomi orali classificati come fenotipo infiammato hanno mostrato esiti clinici di malattia significativamente migliori rispetto a casi con stroma mixoide (sostanza amorfa frammista a collagene ialinizzato casualmente orientato), stroma intermedio (stroma maturo senza componente mixoide frammisto a collagene simil-cheloide) e stroma maturo (stroma maturo con componente mixoide senza collagene simil-cheloide) [192, 193]. Tali correlazioni suggeriscono come una riduzione dell'attività antitumorale locale ed una elevata

reazione stromale possano promuovere la differenziazione e la disseminazione delle cellule del budding lungo il fronte infiltrativo del tumore. Nel microambiente tumorale, le cellule del TB sembrano riflettere l'istantanea di un processo dinamico intrapreso da tumori aggressivi con potenziale metastatico; infatti, esse sono caratterizzate dalla perdita di adesione cellulare, resistenza all'apoptosi, degradazione dello stroma peritumorale e capacità invasiva [88, 147, 172, 194-200]. Pertanto, il TB rappresenterebbe un fenotipo epiteliale dinamico sottoposto a EMT o in de-differenziazione. L'espressione differenziale di alcuni geni EMT-correlati coinvolti nella tumorigenesi orale, come la E-caderina, la β -catenina [147, 172, 195, 201, 202], la Vimentina [147, 172, 203], la Claudina [204], la Laminina 5- α 2 [205-207], la N-caderina, la α -SMA e la Fibronectina [150, 208] supportano tale ipotesi. Tuttavia, le cellule del TB possono subire anche il processo inverso, denominato "transizione mesenchimale-epiteliale" (MET), coinvolto nel rimodellamento della matrice che promuove la disseminazione neoplastica [88, 133, 147, 148, 173, 195-198, 200, 202]. La sottoregolazione della E-caderina e la sovraespressione di Vimentina e di β -catenina sono state riscontrate nelle gemme tumorali degli OSCC e degli OTSCC [172, 195]. Tuttavia, la ritenzione di N-caderina e l'occasionale sovraespressione di Vimentina suggeriscono un processo di EMT parziale [147, 195]. Tale ipotesi è stata corroborata dalla sovraespressione del TGF- β , della Fibronectina 1 e del Collagene tipo I e V, e dalla downregolazione di alcuni fattori trascrizionali di MET, nel fronte infiltrativo piuttosto che nello stroma tumorale [147, 195].

Il valore prognostico del TB nel predire recidive locoregionali di malattia è stato convalidato in differenti tipi di tumori solidi, quali i carcinomi del colon [149, 209, 210], nasofaringei [211], esofagei [212], pancreatici [201] e polmonari [213]; tanto che Wang et al. hanno proposto la valutazione del TB nel carcinoma orale della lingua, in accordo con le raccomandazioni dell'ITBCC [172]. A questo fanno seguito molteplici studi condotti su coorti di OSCC [88, 136, 147, 154, 173, 194, 196-198, 214-221] e di OTSCC [67, 72, 150, 153, 172, 194, 199, 200, 205, 216, 218, 219, 221-228] che hanno confermato il potere del budding tumorale di predire la sopravvivenza globale e lo sviluppo di metastasi linfonodali nel carcinoma orale. In particolare, nelle recenti metanalisi i pazienti affetti da OSCC con elevato numero di TB hanno mostrato un rischio di mortalità specifica da malattia (HR=1,72; 95% CI 1,35-2,18; P<0,00001) [221] e di recidiva locale (HR=1,83; 95% CI 1,34-2,50) [194] quasi raddoppiato ed una sopravvivenza globale estremamente ridotta (HR=2,96; 95% CI 1,36-6,45; P=0,006) rispetto ai soggetti a basso rischio [221], anche analizzando separatamente casi in stadio iniziale (HR=1,94; 95% CI 1,30-2,89; P<0,00001) [220]. Inoltre, un alto punteggio di TB ha predetto efficacemente il rischio di metastasi linfonodali (HR=7,08; 95% CI 1,75-29,73) [194]. Questi dati sono stati estrapolati da un pool di studi che ha dimostrato una correlazione significativa fra numero di TB e gli outcome clinici dei pazienti, sia considerando il numero totale delle cellule del budding [147, 196, 214, 215], sia applicando un cut-off di

3 buds/campo [197], che il sistema ITBCC [225]. Solamente un gruppo di ricerca non ha confermato il ruolo del TB nel predire il rischio di metastasi linfonodali in un campione di carcinomi bucco-gengivali, sottolineando come il WPOI abbia rappresentato l'unico fattore prognostico indipendente di scarsa sopravvivenza. Questo potrebbe essere dovuto alla valutazione del TB stesso, basata sul numero di cellule tumorali in una singola isola neoplastica, che potrebbe influenzare quella del WPOI, in relazione ai differenti criteri di definizione. Inoltre, questi Autori, utilizzando un cut-off pari a 10 buds/campo, hanno considerato tutti gli altri soggetti come pazienti a basso rischio [229]. Risultati analoghi emergono da metanalisi condotte su corti di OTSCC, in cui casi con elevato numero di TB hanno dimostrato un rischio di mortalità globale (HR=2,32; 95% CI 1,40-3,84; P<0,001) e specifica da malattia (HR=1,89; 95% CI 1,13-3,15; P=0,02) [227] ed una probabilità di coinvolgimento linfonodale (HR=3,07; 95% CI 2,08-4,25; P<0,00001) [226] significativamente aumentata. In particolare, metastasi linfonodali occulte sono state diagnosticate in tutti gli OTSCC con ≥ 3 buds/campo [67, 199], suggerendo come tali casi potrebbero beneficiare di una dissezione linfonodale elettiva. Inoltre, il TB è stato in grado di predire la DSS, sia applicando il sistema a due livelli (5 buds/campo), sia lo scoring a tre livelli (ITBCC) [151, 223]. Come emerge dai risultati del presente studio, il budding è stato correlato a molteplici fattori di rischio avversi, quali la presenza margini chirurgici positivi [136, 147], uno stadio patologico avanzato [172, 223], un pattern infiltrativo [67, 71, 173, 196, 219, 225, 229], un DOI ad alto rischio [173, 196, 223], e la positività per LVI, PNI [151, 214] ed ENE [225]. L'ipossia e l'infiammazione rappresentano i principali meccanismi che promuovono la EMT; inoltre, l'invasione in profondità e la presenza di un pattern infiltrativo, influenzando la reazione del microambiente tumorale, possono favorire la disseminazione delle cellule neoplastiche e la formazione del TB [196]. Il budding è stato correlato anche alla giovane età dei pazienti ed al sito linguale e del pavimento orale [136, 147]. Rispetto agli anziani, il sistema immunitario giovanile è maggiormente reattivo: secernendo maggior quantità di chemochine, citochine e fattori di crescita, esso può favorire il processo di EMT e supportare la formazione del TB. Inoltre, il carcinoma della lingua, sede caratterizzata da una rete linfovaskolare ed una struttura muscolare notevolmente sviluppata, rappresenta la forma clinica di cancro orale più comune nei pazienti giovani adulti.

Per determinare una stratificazione di rischio nei pazienti con OSCC sono stati suggeriti differenti cut-off di classificazione del TB. Uno score pari a 5 buds/campo è risultato quello più comunemente utilizzato e convalidato in letteratura [71, 150, 172, 195, 205, 206, 219, 223, 230-235], mentre pochi Autori hanno adottato un cut-off di 3 buds [67, 71, 197, 199, 223] e di 10 buds [88, 215, 228, 236] a campo. Un unico studio ha applicato il cut-off di 15 buds/campo [217] e di 4 buds/campo [237] e solamente due Autori hanno utilizzato un approccio dicotomico (presenza/assenza di TB) [196, 238]. Infine, altri gruppi di ricerca hanno applicato il sistema a tre livelli raccomandato da ITBCC

[149, 200, 223, 229, 239]. Questo è stato convalidato sia in corti di OSCC [229, 239], sia di OTSCC [200, 223]; tuttavia, solo i pazienti “Bd3” hanno mostrato una probabilità significativamente aumentata di metastasi linfonodali e scarsa sopravvivenza specifica da malattia [200, 223, 239], suggerendo come i cut-off proposti dall’ITBCC non siano in grado di stratificare adeguatamente pazienti affetti da carcinoma orale e che occorrerebbe riportare il numero totale di buds tumorali per evitare la perdita di informazioni.

Oltre ai differenti cut-off, sono stati proposti molteplici modelli di rischio. Il primo, il BD Model [150], è stato in grado di predire il rischio di recidive locoregionali [71, 150, 200, 218, 219, 225], la sopravvivenza globale [71, 150, 225] e la sopravvivenza specifica da malattia [222] di pazienti con OTSCC in stadio iniziale; così come la DSS [240] e le metastasi regionali [216] di pazienti con OSCC. Tuttavia, l’inclusione dei DOI rappresenta la maggior criticità del modello, dato che esso rappresenta già un parametro stadiale [217]. Inoltre, il ruolo prognostico del BD model è stato recentemente messo in discussione [217, 223], sia dai risultati del presente studio, sia da quelli pubblicati da Boxberg et al., che non hanno rilevato alcuna differenza significativa fra pazienti del gruppo “BD0” e “BD1”. Pertanto, gli Autori hanno combinato l’attività del budding con le dimensioni delle isole neoplastiche intratumorali e con il grado di differenziazione istologica in un modello capace di predire efficacemente il rischio di metastasi linfonodali, anche stratificando i pazienti in base allo stadio patologico ed al coinvolgimento linfonodale [217, 241]. Anche il gruppo di Elseragy et al. ha integrato il grading istologico con il TB nel RG System, che si è dimostrato più performante nel predire la DSS e la DFS di OTSCC iniziali ad alto rischio rispetto alla sola valutazione del Grading WHO [152]. Tuttavia, i risultati del presente studio non hanno rilevato la capacità del modello di stratificare efficacemente i gruppi di rischio, probabilmente a causa dello scarso valore prognostico del Grading WHO [223].

Il BD Model è stato integrato anche con lo score di Glasgow che, quantificando la reazione infiammatoria nel microambiente tumorale, ha predetto esiti clinici sfavorevoli di malattia (OS, DFS), suggerendo il ruolo critico della infiammazione locale nello sviluppo del TB [151]. Analogamente, Hori et al., combinando il BD Model con l’infiltrazione dei macrofagi CD163+, hanno individuato un maggior rischio metastatico nei pazienti del gruppo 3 [153]. L’infiltrato linfocitario ed il TB sono stati valutati congiuntamente anche al TSR [136, 154] in due modelli predittivi che hanno discriminato efficacemente gli outcome clinici di soggetti con OSCC. Infine, le correlazioni significative emerse fra il punteggio del TSR, la quota di TIL e il numero di TB suggeriscono come una riduzione dell’attività antitumorale locale e una elevata reazione stromale forniscano substrati energetici e fattori di crescita per la disseminazione delle cellule del budding lungo il fronte infiltrativo del tumore [136, 151, 154].

Attualmente la valutazione del TB in campioni di carcinoma orale è stata eseguita prevalentemente in modo manuale su vetrini colorati con ematossilina-eosina. Diverse metanalisi hanno confermato come il ruolo prognostico del TB non differisca fra una valutazione convenzionale ed immunoistochimica. Tuttavia, l'infiltrato peritumorale, i CAF, altre cellule stromali reattive e la frammentazione ghiandolare possono ostacolare l'identificazione, specie nei campioni scarsamente differenziati [172, 200, 219, 234]. Inoltre, i bordi delle cellule epiteliali neoplastiche isolate possono essere facilmente confusi con lo stroma adiacente [172, 200, 219, 231, 234]. Pertanto, l'immunocolorazione con pan-citocheratine può semplificare l'identificazione del TB nonostante possa colorare anche cellule isolate con nuclei multipli, cellule fuse non distinguibili da fibroblasti e/o cellule endoteliali, corpi apoptotici e detriti cellulari, che devono essere esclusi dal conteggio [172]. La valutazione IHC ha mostrato miglior accuratezza e maggior semplicità, indipendentemente dall'esperienza del patologo [198, 231, 232, 237], mentre l'indagine convenzionale è risultata condizionata dal training dell'operatore [232-234, 237]. Alla luce di tali considerazioni, è stato proposto un algoritmo di analisi digitale e semi-automatica delle immagini, che prevede un solo passaggio manuale ovvero la selezione dell'area hotspot su sezione immunocolorata per escludere il tessuto ghiandolare e le aree necrotiche che non possono essere riconosciute dal software. Questo metodo è risultato più riproducibile ed accurato rispetto al manuale, aiutando a superare alcuni limiti della valutazione convenzionale [242]. Pochi studi hanno valutato il TB in campioni di biopsie incisionali [173, 199, 205, 228, 230, 233-235, 243] dato che le ridotte dimensioni, la mancanza di un fronte infiltrativo ed il rischio di frammentazione e di artefatti possono compromettere un'accurata valutazione dei campioni. Tuttavia, alcuni Autori hanno sottolineato la potenzialità del valore di TB preoperatorio, a patto che i campioni siano rappresentativi ed includano la parte più profonda del tumore primario [199, 230, 236], suggerendo di eseguire una o più biopsie (8 x 5 mm) che comprendano anche tessuto clinicamente sano [230, 235]. In tali condizioni, il punteggio del TB preoperatorio è risultato un buon predittore di recidiva locoregionale [173] dimostrando una eccellente specificità (100%) nel predire i valori di TB postoperatori [228, 230]; tanto che è stata proposta la sua valutazione in sezioni congelate immunocolorate per eseguire, senza interruzione dell'anestesia generale, una dissezione linfonodale elettiva del collo nei casi iniziali ad alto rischio [150]. Inoltre, è stata proposta la sua valutazione insieme a quella del POI per determinare i tempi e le modalità del follow-up clinico-radiografico e/o per selezionare i casi candidabili ad una dissezione linfonodale profilattica [229]. Pertanto, qualora fosse validato uno scoring system basato sul sito e sullo stadio di malattia, il TB potrebbe essere introdotto nella pratica istopatologica di routine per migliorare il management dei pazienti e per determinare la prognosi dei carcinomi orali localizzati nei siti in cui il DOI non è applicabile per predire le caratteristiche tumorali.

La prognosi scarsa dei pazienti con alta percentuale di stroma, scarsa reazione infiammatoria e alto numero di TB potrebbe essere attribuita all'interazione fra le cellule tumorali neoplastiche e i CAF. Essi svolgono un ruolo cruciale nella tumorigenesi del carcinoma orale grazie alla loro abilità di secernere grandi quantità di ECM e differenti sottotipi di collagene. Infatti, lo sviluppo e la progressione neoplastica sono caratterizzati da notevoli cambiamenti morfologici ed architetture della matrice, le cui caratteristiche biologiche dipendono proprio dalla quantità e dall'organizzazione del collagene stesso. Esso costituisce oltre il 34% delle proteine totali di matrice, risultando parte integrante dello stroma connettivale a cui fornisce integrità strutturale e resistenza tensile e di cui regola il rimodellamento. Inoltre, il collagene viene considerato una barriera protettiva contro la migrazione delle cellule epiteliali neoplastiche nei tessuti sani mediante abbondante deposizione di stroma che aumenta la rigidità e la resistenza meccanica dei tessuti. Tuttavia, se alterato, questo è in grado di promuovere la disseminazione metastatica inibendo la risposta immunitaria dell'ospite, facilitando la mobilitazione delle cellule neoplastiche nello stroma ed incrementando i fenomeni di proteolisi.

In condizioni fisiologiche, il Collagene tipo I, un collagene maturo caratterizzato da fibre spesse e densamente connesse compone oltre il 90% dello stroma, mentre il restante 8-10% è occupato da Collagene tipo III, immaturo e formato da sottili fibrille poco connesse. Questo rapporto tende ad invertirsi nella progressione neoplastica di malattia, ma quale sia il meccanismo che determina tale variazione non è ancora stato definito. Alcuni studi suggeriscono che uno stato di ipossia possa indurre attivazione dei CAF che, aumentando l'attività delle collagenasi, renderebbero lo stroma edematoso ed instabile con generazione di collagene alterato. Altri studi ipotizzano che l'infiammazione cronica possa causare la formazione di collagene disorganizzato e scarsamente connesso dato che le cellule tumorali anaplastiche producono citochine che attivano le cellule immunitarie a produrre elevate quantità di MMP e specie reattive dell'ossigeno [244].

In particolare, la migrazione epiteliale neoplastica sembrerebbe essere influenzata proprio dall'allineamento, dalla disposizione e dal diametro delle fibrille di Collagene di tipo I [206, 244-247]. Bordoloi et al. hanno dimostrato come l'orientamento delle fibre collagene sia tendenzialmente parallelo nella maggior parte degli OSCC ben differenziati (53,9%) con significativa perdita di organizzazione negli OSCC moderatamente (76,5%) e scarsamente (100%) differenziati ($P=0,008$). Anche la disposizione spaziale delle fibre collagene si è ridotta significativamente ($P=0,005$) nel passaggio da campioni di mucosa orale clinicamente sana e OSCC ben differenziati a carcinomi moderatamente e scarsamente differenziati. Questo potrebbe essere dovuto alla maggiore sintesi e al maggior cross-linking del collagene fibrillare da parte dei CAF o dei miofibroblasti attivati e alla maggior degradazione dello stroma tumorale [248]. Analogamente, anche lo spessore medio delle fibre ed il volume occupato si riducono significativamente, quindi,

casi poco differenziati sarebbero caratterizzati dalla presenza di piccole fibrille formanti collagene immaturo. Questo potrebbe essere dovuto ad un'iniziale risposta fibro-proliferativa ed all'aumentata attività delle MMP-1, adibite alla degradazione del Collagene tipo I. Pertanto, la progressione di malattia sembrerebbe caratterizzata dalla perdita di connessione e di organizzazione del collagene che esita in uno stroma poco maturo e scarsamente funzionale. Lo spessore e la connessione delle fibre influenza anche la birifrangenza delle fibre collagene che ha mostrato una variazione di colore ($P=0,008$), dall'arancione-rosso, al giallo-arancione fino al verde-giallo, e di intensità ($P=0,001$), da forte a debole, rispettivamente in campioni sani e di grado G1 a quelli di moderatamente e scarsamente differenziati. Una forte birifrangenza di color rosso-arancione è risultata correlata a fibre più spesse, mentre una debole birifrangenza di colore giallo-verde si associa a fibrille e a collagene immaturo [246, 248-251]. In particolare, Kumari et al. hanno osservato in tumori ben differenziati la presenza di fibre prevalentemente rosso-arancioni e giallo-arancioni assistendo ad un graduale e significativo cambio del colore e della intensità della birifrangenza verso il verde-giallo negli OSCC G2 e G3 ($P<0,001$). Inoltre, gli Autori hanno dimostrato come la quantità di Collagene tipo III sia significativamente aumentata passando da casi ben differenziati (40%) a casi moderatamente (80%) e scarsamente differenziati (90%) ($P<0,001$). Tali differenze potrebbero essere dovute all'azione enzimatica delle collagenasi e delle MMP secrete dalle cellule stromali e dalla proliferazione incontrollata delle cellule tumorali de-differenziate che stimolerebbero una produzione di anomala di matrice e di stroma disorganizzato [246]. Fibre spesse, densamente arrangiate e ben organizzate, con intensa birifrangenza di color rosso-giallo sono state riscontrate anche in prossimità delle isole tumorali di OSCC dal fronte infiltrativo coesivo, mentre un cambiamento graduale e significativo ($P<0,01$) nella natura delle fibre è stata osservata nei tumori dal fronte non coesivo, caratterizzati da fibre sottili, scarsamente connesse, dalla debole birifrangenza giallo-arancione e verde-giallo. Inoltre, un collagene più lasso è stato dimostrato in tumori con pT elevato (80%; $P<0,047$), metastasi linfonodali (90%; $P=0,026$) e stadio patologico avanzato (85%; $P=0,016$). Al contrario fibre densamente connesse sono state riscontrate in oltre la metà dei casi in stadio iniziale e senza coinvolgimento linfonodale. Pertanto, un pattern di invasione coesivo e fibre collagene ben organizzate sembrerebbero prevenire l'invasione neoplastica nei tessuti sani [245]. Anche i recenti dati pubblicati da Samyukta et al. supportano tali risultati: campioni di mucosa orale clinicamente sana hanno mostrato fibre collagene prevalentemente colorate di rosso, indicative di Collagene di tipo I, campioni displastici hanno esibito un lieve cambiamento del rapporto fra Collagene tipo I (rosso) e Collagene tipo III (blu), pur in prevalenza di fibre collagene rosse, mentre nei campioni di OSCC è stato rilevato un marcato cambiamento di distribuzione delle fibre che hanno esibito una colorazione prevalentemente bluastra. Tali differenze sono risultate significative anche quantificando la distribuzione del Collagene tipo I e tipo III fra il

gruppo delle lesioni neoplastiche e degli OPMD ($P < 0,05$) [244] e supportate da altri gruppi di ricerca [246, 252]. Infine, anche gli studi di risonanza nucleare sull'aggregazione fisica delle fibre di collagene hanno rilevato un profilo di color arancione-rosso corrispondente a fibre densamente connesse, mentre il color verde-giallo ha caratterizzato fibre scarsamente imballate.

Analizzando i risultati del presente studio, le fibre collagene dello stroma extratumorale sono risultate più spesse e ravvicinate, indicative della presenza di un collagene maturo e denso, mentre fibre più sottili e scarsamente interconnesse hanno caratterizzato lo stroma del fronte infiltrativo ed intratumorale. Pertanto, le fibre più lontane dal tumore potrebbero conferire al tessuto stromale maggior funzionalità, resistenza meccanica, tensione tissutale ed una miglior organizzazione spaziale, così da promuovere l'effetto barriera contro l'invasione tumorale. Al contrario, nel fronte infiltrativo e nella massa neoplastica, le cellule tumorali in proliferazione ed in fase di invasione tumorale attiva potrebbero promuovere l'alterazione dell'orientamento e della disposizione delle fibre, esitando in uno stroma modificato, lasso ed edematoso, che potrebbe facilitare la migrazione e la disseminazione maligna. Infine, la maggior quota di collagene disperso nella massa tumorale centrale potrebbe determinare il raggruppamento delle cellule epiteliali neoplastiche in piccoli nidi infiltranti che caratterizzano tumori dal pattern invasivo.

Applicando un cut-off pari al 23%, OSCC con pT elevato ($P=0,037$), metastasi linfonodali ($P=0,016$) e stadio patologico avanzato ($P=0,046$) hanno dimostrato un volume percentuale di collagene significativamente più alto rispetto a casi di piccole dimensioni, senza coinvolgimento nodale ed in fase iniziale di malattia. Inoltre, una quota elevata di collagene è risultata fattore prognostico indipendente di scarsa sopravvivenza globale ($HR=2,478$; 95% IC 1,167-5,259; $P=0,018$) e libera da malattia ($HR=2,282$; 95% IC 1,136-4,584; $P=0,020$), con performance predittive superiori rispetto allo stadio patologico ed al grading istologico [206]. Anche i nostri dati riportano associazioni significative fra lo stadio patologico e linfonodale e lo spessore ed il volume percentuale di collagene stromale, così come fra le dimensioni tumorali e la distanza inter-fibrillare. Alterazioni morfometriche non hanno riguardato esclusivamente il Collagene tipo I e tipo III. Infatti, nel fronte infiltrativo di modelli organoidi 3D di carcinoma orale, è stata dimostrata la co-localizzazione del Collagene tipo XVII e della p53. Inoltre, una progressiva alterazione dell'espressione del Collagene tipo XVII e del tipo XVIII è stata determinata nei differenti stadi della carcinogenesi orale. In particolare, la sottoregolazione di Collagene tipo XVII è stata rilevata nelle cellule basali di forme displastiche lievi, mentre una sovraregolazione è stata riscontrata nei cheratinociti sopra-basali di lesioni displastiche moderate o severe, di OSCC moderatamente e scarsamente differenziati e di linee cellulari di OSCC invasivo [253].

L'organizzazione e la struttura del collagene sono state indagate principalmente mediante tecniche di imaging bidimensionali, come la microscopia ottica ed elettronica capaci di analizzare i fasci e le

fibre collagene a differenti livelli di ingrandimento mediante l'utilizzo di specifiche colorazioni, e la microscopia elettronica a trasmissione in grado di determinare anche l'orientamento delle fibre stesse. L'avvento della luce di sincrotrone ha apportato una nuova dimensione alle tecniche di imaging radiologico aprendo nuove strade per l'implementazione di metodiche innovative capaci di raggiungere un'elevata risoluzione spaziale e temporale e di studiare la morfologia e la microstruttura dei campioni, con tempi di acquisizione dei dati notevolmente ridotti, in maniera non distruttiva e senza l'utilizzo di mezzi di contrasto. In particolare, l'implementazione della microtomografia a raggi X in modalità a contrasto di fase ha permesso di intraprendere nuove indagini per lo studio dei tessuti connettivi molli, non visibili al contrasto di assorbimento. Grazie all'XRPT ad alta risoluzione è stato possibile identificare i differenti tessuti che partecipano al processo di rigenerazione ossea, quali il collagene e le strutture mineralizzate come la rete dei canali haversiani e le lacune osteocitarie. Analogamente è stata impiegata per valutare le caratteristiche microstrutturali e meccaniche dell'osso alveolare e dei tessuti che compongono l'apparato di attacco parodontale e peri-implantare in campioni di mandibola umana [180, 254-256], suina e di scimmia [255], anche dopo posizionamento di innesti eterologhi [257] e xenologhi [258] per discriminare tessuti con coefficienti di assorbimento simili, quali vasi sanguigni e osso calcificato in condizioni sperimentali definite. In particolare, l'organizzazione dei fasci di fibre collagene peri-implantari è stata caratterizzata tridimensionalmente, determinando la presenza di fasci trasversali e longitudinali reciprocamente incrociati attorno al collo implantare. Nei piani longitudinali, più i fasci di fibre sono vicini all'impianto, più il loro andamento risulta regolare e simmetrico, mentre trasversalmente le fibre collagene semicircolari si intersecano nella lamina propria e terminano nell'epitelio orale [180]. Applicata in diversi studi di ingegneria tissutale, la microtomografia a SR ha caratterizzato in vitro la matrice extracellulare di nuova formazione [259], le prime colonie di cellule endoteliali [258], le fasi iniziali della mineralizzazione di osso alveolare [260, 261], la osteo-rigenerazione della sutura palatina mediana [262], il potenziale osteogenico delle cellule staminali della polpa dentale [263], le proprietà osteo-induttive delle cellule staminali del legamento parodontale [260, 261] ed i marcatori di crescita dello smalto prenatale [264]. Sono stati testati anche alcuni biomateriali, sia in condizioni acellulari [265], sia in combinazione con cellule in vitro [260, 261], per l'applicazione clinica in difetti ossei alveolari e mascellari. [266, 267]. Infine, l'imaging in vivo ed ex vivo a luce di sincrotrone è stato impiegato in studi esplorativi e preclinici volti alla valutazione ultrastrutturale della morfologia del microcircolo e della rete neurovascolare di vari organi del corpo umano [254, 268, 269]. Il primo studio che ha analizzato la struttura del collagene con metodiche di nano-tomografia a luce di sincrotrone è stato eseguito su campioni di osso corticale femorale umano. La metodica ha consentito di discriminare l'andamento unidirezionale e quasi-parallelo delle fibrille mineralizzate nei piani sub-lamellari delle lamelle

ossee e di verificare i cambiamenti periodici del loro orientamento, indipendentemente dalle fluttuazioni della densità ossea locale [270]. Attualmente, un solo gruppo di ricerca ha analizzato, mediante luce di sincrotrone, le caratteristiche e le modificazioni patologiche delle fibre collagene nello stroma tumorale di campioni di leiomioma uterino rispetto a campioni di miometrio sano. Nei casi patologici la deposizione di collagene è risultata significativamente aumentata e le fibre hanno acquisito una struttura eterotipica ed un orientamento alterato rispetto ai controlli sani. In particolare, è stato determinato un incremento dello spessore, della numerosità e della connessione fibrillare, coerentemente alla riduzione della distanza media e della superficie specifica delle fibre stesse, responsabile dell'aumentata rigidità dei tessuti tumorali, in virtù della natura fibrotica della patologia [266, 267]. Pertanto, attualmente lo studio in esame rappresenta la prima indagine esplorativa condotta con microtomografia a SR su neoplasie di origine epiteliale e del distretto testa-collo.

8. CONCLUSIONI

La presente ricerca rappresenta il primo studio che ha analizzato i parametri morfologici e morfometrici dello stroma tumorale in campioni di carcinoma orale, combinando una metodica convenzionale quale la microscopia ottica, ed una tecnica di imaging avanzata quale la microtomografia a luce di sincrotrone. Pertanto, i risultati potrebbero fornire un contributo significativo per la comprensione della riorganizzazione del microambiente tumorale nella progressione neoplastica di questa malattia. La valutazione bidimensionale delle caratteristiche istopatologiche dello stroma tumorale del fronte infiltrativo potrebbe migliorare la determinazione dei fattori di rischio e migliorare la stadiazione patologica. Questa analisi è stata condotta su una dimensione campionaria sufficientemente ampia. Tuttavia, la natura retrospettiva dello studio ed il setting limitato correlato all'origine monocentrica dei casi selezionati richiede necessariamente la conduzione di studi di validazione di natura preferibilmente prospettica e di tipo multicentrico. L'analisi morfometrica degli indici strutturali dello stroma tumorale mediante microtomografia a luce di sincrotrone rappresenta il primo studio esplorativo eseguito su neoplasie di origine epiteliale e nel distretto testa-collo, in particolare nel cavo orale. Le ricostruzioni 3D ad alta risoluzione dell'ultrastruttura delle fibre collagene e della matrice extracellulare dello stroma tumorale potrebbero facilitare la discriminazione fra una distribuzione sana e una patologica di collagene e permettere una miglior comprensione dei rapporti fra epitelio neoplastico e stroma tumorale, fornendo nuove metodologie per futuri studi della matrice extracellulare di tessuti molli di differenti distretti corporei.

Tuttavia, la ridotta dimensione campionaria impedisce la generalizzabilità dei risultati alla popolazione di riferimento e l'analisi di un singolo focus per ogni volume stromale estratto da ogni campione chirurgico impedisce la valutazione della variabilità intratumorale degli indici stessi. Inoltre, la mancata inclusione del corrispettivo controllo sano non ha permesso di determinare alcuna differenza fra stroma tumorale e stroma fisiologico caratteristico del cavo orale. Alla luce di tali considerazioni, occorre necessariamente aumentare la dimensione campionaria selezionando i casi non solo sulla base dei dati clinico-patologici macroscopici ma anche sulla base dei risultati ottenuti, includere campioni di mucosa orale clinicamente sana e sviluppare una metodica di campionamento multiplo che consenta una valutazione intratumorale esaustiva degli indici strutturali dello stroma tumorale e fisiologico. La mole di dati estraibili dalle analisi morfologiche e morfometriche su di un'ampia coorte di pazienti potrebbe essere utilizzata per costruire modelli prognostici che includano dati valutati con metodiche di analisi microscopica e nanoscopica (ad esempio istochimica, immunoistochimica e spettroscopia ottica), al fine di raggiungere una conoscenza multilivello della malattia. A tal proposito, è auspicabile l'impiego di approcci di intelligenza artificiale, come il machine learning o le reti neurali artificiali, in grado di raccogliere le relazioni non lineari all'interno di grandi moli di dati e individuare le combinazioni migliori in termini di accuratezza prognostica.

9. 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. El-Naggar, A.K., *Editor's perspective on the 4th edition of the WHO head and neck tumor classification*. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2017. **29**(2): p. 65-66.
4. National Cancer Institute. Surveillance, E., and End Results Program., *Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancers*. 2021.
5. Cancer, I.A.f.R.o., *Lip, Oral Cavity*. *The Globocal Cancer Observatory*. 2020, World Oral Health Organization. p. 2.
6. Mao, L., W.K. Hong, and V.A. Papadimitrakopoulou, *Focus on head and neck cancer*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(4): p. 311-6.
7. Gillison, M.L., *Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers*. *Head Neck*, 2007. **29**(8): p. 779-92.
8. Mathers, C.D., et al., *Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: I. Application of regional cancer survival model to estimate cancer mortality distribution by site*. *BMC Cancer*, 2002. **2**: p. 36.
9. Liao, C.T., et al., *Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2008. **15**(3): p. 915-22.
10. Liao, C.T., et al., *Survival of second and multiple primary tumors in patients with oral cavity squamous cell carcinoma in the betel quid chewing area*. *Oral Oncol*, 2007. **43**(8): p. 811-9.
11. Yen, A.M., et al., *The effect of betel quid and cigarette on multistate progression of oral pre-malignancy*. *J Oral Pathol Med*, 2008. **37**(7): p. 417-22.
12. Yen, T.T., et al., *The association of smoking, alcoholic consumption, betel quid chewing and oral cavity cancer: a cohort study*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008. **265**(11): p. 1403-7.
13. La Vecchia, C., et al., *Trends in oral cancer mortality in Europe*. *Oral Oncol*, 2004. **40**(4): p. 433-9.
14. Szabolcs, O., *Cancer epidemiology in Hungary and the Bela Johan National Program for the decade of health*. *Pathol Oncol Res*, 2003. **9**(2): p. 126-30.
15. Nemes, J.A., et al., *Oral cancer report from Northeastern Hungary*. *Pathol Oncol Res*, 2008. **14**(1): p. 85-92.
16. Lo Muzio, L.P., S., *Carcinoma orale. Manuale di riferimento*. 1 ed. Vol. 1. 320.
17. Berrino, F., *The EUROCARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies*. *Ann Oncol*, 2003. **14 Suppl 5**: p. v9-13.
18. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, *Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence*. *Oral Oncol*, 2005. **41**(3): p. 244-60.
19. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. *CA Cancer J Clin*, 2002. **52**(4): p. 195-215.
20. Lewin, F., et al., *Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden*. *Cancer*, 1998. **82**(7): p. 1367-75.
21. 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.
22. Wang, M., et al., *Correlation of Betel Quid with Oral Cancer from 1998 to 2017: A Study Based on Bibliometric Analysis*. *Chin Med J (Engl)*, 2018. **131**(16): p. 1975-1982.
23. Neville, B.W., *Oral and Maxillofacial Pathology. Fourth Edition*. 4 ed. Vol. 1. 2016: Elsevier. 878.

24. 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.
25. Boffetta, P. and M. Hashibe, *Alcohol and cancer*. Lancet Oncol, 2006. **7**(2): p. 149-56.
26. Ogden, G.R., *Alcohol and oral cancer*. Alcohol, 2005. **35**(3): p. 169-73.
27. Debta, P., et al., *Evaluation of Candidiasis in Upper-Aerodigestive Squamous Cell Carcinoma Patients-A Clinico-Mycological Aspect*. Int J Environ Res Public Health, 2022. **19**(14).
28. Miller, C.S. and B.M. Johnstone, *Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. **91**(6): p. 622-35.
29. Nagpal, J.K., S. Patnaik, and B.R. Das, *Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India*. Int J Cancer, 2002. **97**(5): p. 649-53.
30. Thompson, I.O., et al., *A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium*. Arch Oral Biol, 2001. **46**(12): p. 1091-8.
31. Husain, R.S. and V. Ramakrishnan, *Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies*. Ann Glob Health, 2015. **81**(5): p. 675-83.
32. Cruz, I., et al., *No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels*. Int J Cancer, 2000. **86**(3): p. 356-61.
33. Kreimer, A.R., et al., *Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: analysis from the IARC multinational case-control study*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2293-7.
34. Garavello, W., et al., *The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk*. Minerva Stomatol, 2009. **58**(1-2): p. 25-34.
35. Lucenteforte, E., et al., *Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk*. Oral Oncol, 2009. **45**(6): p. 461-7.
36. Hasegawa, W., et al., *Long-term follow-up of secondary malignancies in adults after allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(1): p. 51-5.
37. de Visscher, J.G., J.N. Bouwes Bavinck, and I. van der Waal, *Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients. Report of six cases*. Int J Oral Maxillofac Surg, 1997. **26**(2): p. 120-3.
38. Scheifele, C., et al., *Incidence of oral, pharyngeal, and laryngeal squamous cell carcinomas among 1515 patients after liver transplantation*. Oral Oncol, 2005. **41**(7): p. 670-6.
39. Brown, L.M., et al., *Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico*. Cancer, 2001. **92**(8): p. 2102-8.
40. Warnakulasuriya, S., *Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management*. Oral Oncol, 2020. **102**: p. 104550.
41. Lee, J.J., et al., *Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(4): p. 472-80.
42. Warnakulasuriya, S., *Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018. **125**(6): p. 582-590.
43. Liu, W., et al., *Characteristics and trends of oral leukoplakia research: A bibliometric study of the 100 most cited articles*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(27): p. e16293.
44. Speight, P.M., S.A. Khurram, and O. Kujan, *Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018. **125**(6): p. 612-627.
45. Pentenero, M., et al., *Oral leukoplakia diagnosis and treatment in Europe and Australia: Oral Medicine Practitioners' attitudes and practice*. Oral Dis, 2022.
46. Ranganathan, K. and L. Kavitha, *Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders*. J Oral Maxillofac Pathol, 2019. **23**(1): p. 19-27.

47. de Azevedo, A.B., et al., *Oral leukoplakia, leukoerythroplakia, erythroplakia and actinic cheilitis: Analysis of 953 patients focusing on oral epithelial dysplasia*. J Oral Pathol Med, 2021. **50**(8): p. 829-840.
48. Iocca, O., et al., *Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype*. Head Neck, 2020. **42**(3): p. 539-555.
49. Hoffman, G.R. and J.P. Hayter, *Widespread subcutaneous distant metastases from a head and neck squamous cell carcinoma*. J Oral Maxillofac Surg, 2002. **60**(8): p. 954-8.
50. de Bree, R., et al., *Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer*. Laryngoscope, 2000. **110**(3 Pt 1): p. 397-401.
51. Cuffari, L., et al., *Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **102**(1): p. 56-61.
52. Hechler, B., et al., *Are Oral Pain and Otagia Predictive of Perineural Invasion in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue?* J Oral Maxillofac Surg, 2020. **78**(8): p. 1418-1426.
53. Tilstone, C., *Dentists: a crucial part to play in oral cancer*. Lancet Oncol, 2007. **8**(7): p. 575.
54. Akintoye, S.O. and M. Mupparapu, *Clinical Evaluation and Anatomic Variation of the Oral Cavity*. Dermatol Clin, 2020. **38**(4): p. 399-411.
55. Bagan, J., G. Sarrion, and Y. Jimenez, *Oral cancer: clinical features*. Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 414-7.
56. Barnes, L., *Surgical pathology of Head and Neck. Third Edition*. Vol. 1. 2009. 590.
57. Arya, S., D. Chaukar, and P. Pai, *Imaging in oral cancers*. Indian J Radiol Imaging, 2012. **22**(3): p. 195-208.
58. Barnes, L.e.a., *Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization classification of tumours.*, ed. L.H.S. Paul Kleihues. 2005: Lyon. 430.
59. Amin, M.B., et al., *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(2): p. 93-99.
60. Umstattd, L.A., et al., *Shrinkage in oral squamous cell carcinoma: An analysis of tumor and margin measurements in vivo, post-resection, and post-formalin fixation*. Am J Otolaryngol, 2017. **38**(6): p. 660-662.
61. Bryne, M., et al., *New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas*. J Oral Pathol Med, 1989. **18**(8): p. 432-7.
62. Dik, E.A., et al., *The value of histological grading of biopsy and resection specimens in early stage oral squamous cell carcinomas*. J Craniomaxillofac Surg, 2018. **46**(6): p. 1001-1006.
63. Jain, D., et al., *A semi-quantitative World Health Organization grading scheme evaluating worst tumor differentiation predicts disease-free survival in oral squamous carcinoma patients*. Ann Diagn Pathol, 2017. **29**: p. 1-6.
64. Brandwein-Gensler, M., et al., *Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(2): p. 167-78.
65. De Silva, R.K., et al., *A model to predict nodal metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201755.
66. Siriwardena, B., et al., *A Predictive Model to Determine the Pattern of Nodal Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 8925818.
67. Chatterjee, D., et al., *Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated With Poor Survival in Early-Stage Tumors*. Ear Nose Throat J, 2019. **98**(7): p. E112-E119.
68. Pu, Y., et al., *Biopsy pattern of invasion type to determine the surgical approach in early-stage oral squamous cell carcinoma*. Virchows Arch, 2021. **479**(1): p. 109-119.

69. Yue, L.E., et al., *Oral squamous carcinoma: Aggressive tumor pattern of invasion predicts direct mandible invasion*. *Head Neck*, 2020. **42**(11): p. 3171-3178.
70. Almangush, A., et al., *For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality*. *Virchows Arch*, 2015. **467**(1): p. 39-46.
71. Almangush, A., et al., *Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer*. *Head Neck*, 2014. **36**(6): p. 811-8.
72. Hori, Y., et al., *Association between pathological invasion patterns and late lymph node metastases in patients with surgically treated clinical No early oral tongue carcinoma*. *Head Neck*, 2020. **42**(2): p. 238-243.
73. Heerema, M.G., et al., *Reproducibility and prognostic value of pattern of invasion scoring in low-stage oral squamous cell carcinoma*. *Histopathology*, 2016. **68**(3): p. 388-97.
74. Wu, K., et al., *Can pattern and depth of invasion predict lymph node relapse and prognosis in tongue squamous cell carcinoma*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 714.
75. Kohler, H.F., et al., *The impact of worst pattern of invasion on the extension of surgical margins in oral squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2022. **44**(3): p. 691-697.
76. Li, Y., et al., *Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma*. *Head Neck Pathol*, 2013. **7**(3): p. 211-23.
77. Muller, S., et al., *Data Set for the Reporting of Oral Cavity Carcinomas: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration of Cancer Reporting*. *Arch Pathol Lab Med*, 2019. **143**(4): p. 439-446.
78. Brinkman, D., et al., *Comparison of royal college of pathologists and college of american pathologists definition for positive margins in oral cavity squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2022. **127**: p. 105797.
79. Liebig, C., et al., *Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(31): p. 5131-7.
80. Tarsitano, A., M.L. Tardio, and C. Marchetti, *Impact of perineural invasion as independent prognostic factor for local and regional failure in oral squamous cell carcinoma*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2015. **119**(2): p. 221-8.
81. Aivazian, K., et al., *Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: quantitative subcategorisation of perineural invasion and prognostication*. *J Surg Oncol*, 2015. **111**(3): p. 352-8.
82. Cracchiolo, J.R., et al., *Patterns of recurrence in oral tongue cancer with perineural invasion*. *Head Neck*, 2018. **40**(6): p. 1287-1295.
83. Miller, M.E., et al., *A novel classification system for perineural invasion in noncutaneous head and neck squamous cell carcinoma: histologic subcategories and patient outcomes*. *Am J Otolaryngol*, 2012. **33**(2): p. 212-5.
84. Wei, P.Y., W.Y. Li, and S.K. Tai, *Discrete Perineural Invasion Focus Number in Quantification for T1-T2 Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019. **160**(4): p. 635-641.
85. Colevas, A.D., et al., *NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2018. **16**(5): p. 479-490.
86. Shen, W.R., et al., *Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2014. **43**(4): p. 258-64.
87. Hasmat, S., et al., *Multifocal perineural invasion is a better prognosticator than depth of invasion in oral squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2019. **41**(11): p. 3992-3999.
88. Angadi, P.V., et al., *Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma*. *Int J Surg Pathol*, 2015. **23**(2): p. 102-10.

89. Chen, T.C., et al., *The impact of perineural invasion and/or lymphovascular invasion on the survival of early-stage oral squamous cell carcinoma patients*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20**(7): p. 2388-95.
90. Lee, L.Y., et al., *Prognostic impact of extratumoral perineural invasion in patients with oral cavity squamous cell carcinoma*. *Cancer Med*, 2019. **8**(14): p. 6185-6194.
91. Tai, S.K., et al., *Risks and clinical implications of perineural invasion in T1-2 oral tongue squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2012. **34**(7): p. 994-1001.
92. Tai, S.K., et al., *Treatment for T1-2 oral squamous cell carcinoma with or without perineural invasion: neck dissection and postoperative adjuvant therapy*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(6): p. 1995-2002.
93. Tai, S.K., et al., *Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection*. *Am J Surg Pathol*, 2013. **37**(8): p. 1164-72.
94. Jardim, J.F., et al., *Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2015. **44**(1): p. 23-8.
95. Ling, W., A. Mijiti, and A. Moming, *Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases*. *J Oral Maxillofac Surg*, 2013. **71**(4): p. 775-85.
96. Caponio, V.C.A., et al., *Pattern and localization of perineural invasion predict poor survival in oral tongue carcinoma*. *Oral Dis*, 2021.
97. Bur, A.M., A. Lin, and G.S. Weinstein, *Adjuvant radiotherapy for early head and neck squamous cell carcinoma with perineural invasion: A systematic review*. *Head Neck*, 2016. **38 Suppl 1**: p. E2350-7.
98. da Silva, S.D. and L.P. Kowalski, *Perineural invasion in oral cancer: challenges, controversies and clinical impact*. *Chin Clin Oncol*, 2019. **8**(S1): p. S5.
99. Schmitd, L.B., C.S. Scanlon, and N.J. D'Silva, *Perineural Invasion in Head and Neck Cancer*. *J Dent Res*, 2018. **97**(7): p. 742-750.
100. Larson, A.R., et al., *Beyond Depth of Invasion: Adverse Pathologic Tumor Features in Early Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma*. *Laryngoscope*, 2020. **130**(7): p. 1715-1720.
101. Mascitti, M., et al., *Lymphovascular invasion as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma: a comprehensive review*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2021.
102. Zhang, Z., J.I. Helman, and L.J. Li, *Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial cells and lymphatic metastasis in head and neck cancer--a review of mechanisms*. *Int J Oral Sci*, 2010. **2**(1): p. 5-14.
103. Tarin, D., *Role of the host stroma in cancer and its therapeutic significance*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(3-4): p. 553-66.
104. D'Arcangelo, E., et al., *The life cycle of cancer-associated fibroblasts within the tumour stroma and its importance in disease outcome*. *Br J Cancer*, 2020. **122**(7): p. 931-942.
105. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. *J Cell Biochem*, 2007. **101**(4): p. 805-15.
106. Valkenburg, K.C., A.E. de Groot, and K.J. Pienta, *Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(6): p. 366-381.
107. Nanci, A., *Ten Cate's Oral Histology - Development, Structure, and Function*. 9 ed. Vol. 1. 2018: Elsevier. 352.
108. Arneth, B., *Tumor Microenvironment*. *Medicina (Kaunas)*, 2019. **56**(1).
109. Liotta, L.A. and E.C. Kohn, *The microenvironment of the tumour-host interface*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 375-9.
110. Bremnes, R.M., et al., *The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(1): p. 209-17.

111. Mascitti, M., et al., *Addition of the tumour-stroma ratio to the 8th edition American Joint Committee on Cancer staging system improves survival prediction for patients with oral tongue squamous cell carcinoma*. *Histopathology*, 2020. **77**(5): p. 810-822.
112. Bussard, K.M., et al., *Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment*. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 84.
113. Pietras, K. and A. Ostman, *Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(8): p. 1324-31.
114. Sund, M. and R. Kalluri, *Tumor stroma derived biomarkers in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 177-83.
115. Dawe, C.J., W.D. Morgan, and M.S. Slatick, *Influence of epithelio-mesenchymal interactions on tumor induction by polyoma virus*. *Int J Cancer*, 1966. **1**(5): p. 419-50.
116. Takabatake, K., et al., *Impact of the Stroma on the Biological Characteristics of the Parenchyma in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
117. Shan, Q., et al., *Stromal cells in the tumor microenvironment promote the progression of oral squamous cell carcinoma*. *Int J Oncol*, 2021. **59**(3).
118. Shan, Q., et al., *Significance of cancer stroma for bone destruction in oral squamous cell carcinoma using different cancer stroma subtypes*. *Oncol Rep*, 2022. **47**(4).
119. Ding, L., et al., *alpha-Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2014. **43**(5): p. 335-43.
120. Marsh, D., et al., *Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients*. *J Pathol*, 2011. **223**(4): p. 470-81.
121. Bello, I.O., et al., *Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer*. *Oral Oncol*, 2011. **47**(1): p. 33-8.
122. Vered, M., et al., *Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(6): p. 1356-62.
123. Vered, M., et al., *Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(1): p. 274-80.
124. Kellermann, M.G., et al., *Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis*. *Histopathology*, 2007. **51**(6): p. 849-53.
125. Vered, M., et al., *Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions*. *Cancer Microenviron*, 2009. **2**(1): p. 49-57.
126. Kellermann, M.G., et al., *Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation*. *Oral Oncol*, 2008. **44**(5): p. 509-17.
127. Salo, T., et al., *Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches*. *Exp Cell Res*, 2014. **325**(2): p. 58-64.
128. Costea, D.E., A.C. Johannessen, and O.K. Vintermyr, *Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during in vitro tumor progression*. *Differentiation*, 2005. **73**(4): p. 134-41.
129. Salo, S., et al., *Human bone marrow mesenchymal stem cells induce collagen production and tongue cancer invasion*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77692.
130. Vilen, S.T., et al., *Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma*. *ScientificWorldJournal*, 2013. **2013**: p. 920595.
131. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 891-906.
132. Egeblad, M., M.G. Rasch, and V.M. Weaver, *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 697-706.

133. Almangush, A., et al., *Prognostic impact of tumour-stroma ratio in early-stage oral tongue cancers*. *Histopathology*, 2018. **72**(7): p. 1128-1135.
134. Huang, S., et al., *Tumor-stroma ratio is a crucial histological predictor of occult cervical lymph node metastasis and survival in early-stage (cT1/2N0) oral squamous cell carcinoma*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2022. **51**(4): p. 450-458.
135. Almangush, A., et al., *Clinical significance of tumor-stroma ratio in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Cancer*, 2021. **21**(1): p. 480.
136. Dourado, M.R., et al., *Prognostication for oral squamous cell carcinoma patients based on the tumour-stroma ratio and tumour budding*. *Histopathology*, 2020. **76**(6): p. 906-918.
137. Niranjan, K.C. and N.A. Sarathy, *Prognostic impact of tumor-stroma ratio in oral squamous cell carcinoma - A pilot study*. *Ann Diagn Pathol*, 2018. **35**: p. 56-61.
138. Qiu, J., E. Jiang, and Z. Shang, *Prognostic value of tumor-stroma ratio in oral carcinoma: Role of cancer-associated fibroblasts*. *Oral Dis*, 2022.
139. Zhang, X.L., et al., *The tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in nasopharyngeal cancer*. *Oncol Res Treat*, 2014. **37**(9): p. 480-4.
140. Zhang, H., et al., *The prognostic value of tumor budding in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Transl Cancer Res*, 2020. **9**(1): p. 119-127.
141. Karpathiou, G., et al., *Correlation Between Semiquantitative Metabolic Parameters After PET/CT and Histologic Prognostic Factors in Laryngeal and Pharyngeal Carcinoma*. *Head Neck Pathol*, 2020. **14**(3): p. 724-732.
142. Karpathiou, G., et al., *Prognostic significance of tumor budding, tumor-stroma ratio, cell nests size, and stroma type in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinomas*. *Head Neck*, 2019. **41**(6): p. 1918-1927.
143. Ueno, H., et al., *Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer*. *Histopathology*, 2002. **40**(2): p. 127-32.
144. Gabbert, H., et al., *Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion*. *Clin Exp Metastasis*, 1985. **3**(4): p. 257-79.
145. Morodomi, T., et al., *An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer*. *Cancer*, 1989. **63**(3): p. 539-43.
146. Hase, K., et al., *Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer*. *Dis Colon Rectum*, 1993. **36**(7): p. 627-35.
147. Jensen, D.H., et al., *Molecular profiling of tumour budding implicates TGFbeta-mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma*. *J Pathol*, 2015. **236**(4): p. 505-16.
148. Li, H., et al., *The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis*. *Cell Adh Migr*, 2016. **10**(4): p. 434-46.
149. Lugli, A., et al., *Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016*. *Mod Pathol*, 2017. **30**(9): p. 1299-1311.
150. Almangush, A., et al., *A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer*. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2015. **44**(2): p. 143-50.
151. Yu, P., et al., *A novel prognostic model for tongue squamous cell carcinoma based on the characteristics of tumour and its microenvironment: iBD score*. *Histopathology*, 2019. **74**(5): p. 766-779.
152. Elseragy, A., et al., *A Proposal to Revise the Histopathologic Grading System of Early Oral Tongue Cancer Incorporating Tumor Budding*. *Am J Surg Pathol*, 2019. **43**(5): p. 703-709.
153. Hori, Y., et al., *Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Tumor Budding in Early Oral Tongue Carcinoma*. *Laryngoscope*, 2021. **131**(11): p. 2512-2518.

154. Sung, Y.E., M.S. Kim, and Y.S. Lee, *Proposal of a scoring system for predicting pathological risk based on a semiautomated analysis of whole slide images in oral squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2021. **43**(5): p. 1581-1591.
155. van Pelt, G.W., et al., *The tumour-stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact*. *Histopathology*, 2018. **73**(2): p. 197-206.
156. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
157. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 1-10.
158. Shaban, M., et al., *A Novel Digital Score for Abundance of Tumour Infiltrating Lymphocytes Predicts Disease Free Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 13341.
159. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. *Nature*, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
160. Hegde, P.S., V. Karanikas, and S. Evers, *The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(8): p. 1865-74.
161. Huang, Z., et al., *The prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis*. *J Oral Pathol Med*, 2019. **48**(9): p. 788-798.
162. Fang, J., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 375.
163. Zhou, C., et al., *Density and location of CD3(+) and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes correlate with prognosis of oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2018. **47**(4): p. 359-367.
164. Quan, H., et al., *The repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes within the microenvironment of oral squamous cell carcinoma reveals immune dysfunction*. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. **69**(3): p. 465-476.
165. Boxberg, M., et al., *Composition and Clinical Impact of the Immunologic Tumor Microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *J Immunol*, 2019. **202**(1): p. 278-291.
166. Heikkinen, I., et al., *Assessment of Tumor-infiltrating Lymphocytes Predicts the Behavior of Early-stage Oral Tongue Cancer*. *Am J Surg Pathol*, 2019. **43**(10): p. 1392-1396.
167. Troiano, G., et al., *The immune phenotype of tongue squamous cell carcinoma predicts early relapse and poor prognosis*. *Cancer Med*, 2020. **9**(22): p. 8333-8344.
168. Snaedal, J., *[The Helsinki Declaration]*. *Laeknabladid*, 2014. **100**(3): p. 135.
169. Altman, D.G., et al., *Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration*. *PLoS Med*, 2012. **9**(5): p. e1001216.
170. Collins, G.S., et al., *Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD Statement*. *BMC Med*, 2015. **13**: p. 1.
171. Mesker, W.E., et al., *The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage*. *Cell Oncol*, 2007. **29**(5): p. 387-98.
172. Wang, C., et al., *Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2011. **40**(7): p. 545-51.
173. Seki, M., et al., *Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 early stage oral squamous cell carcinoma*. *Histopathology*, 2017. **70**(6): p. 869-879.
174. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(2): p. 259-71.

175. Giuliani, A.C.A., *Advanced High-Resolution Tomography in Regenerative Medicine. Three-Dimensional Exploration into the Interactions between Tissues, Cells, and Biomaterials*, ed. Springer. 235.
176. Lotti, P., et al., *Single-crystal diffraction at the high-pressure Indo-Italian beamline Xpress at Elettra, Trieste*. J Synchrotron Radiat, 2020. **27**(Pt 1): p. 222-229.
177. Wilkins, S.W., et al., *On the evolution and relative merits of hard X-ray phase-contrast imaging methods*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2014. **372**(2010): p. 20130021.
178. Henke, B.L., et al., *Design and Characterization of X-Ray Multilayer Analyzers for the 50-1000 eV Region*. J Xray Sci Technol, 1990. **2**(1): p. 17-80.
179. Bravin, A., P. Coan, and P. Suortti, *X-ray phase-contrast imaging: from pre-clinical applications towards clinics*. Phys Med Biol, 2013. **58**(1): p. R1-35.
180. Iezzi, G., et al., *The Symmetric 3D Organization of Connective Tissue around Implant Abutment: A Key-Issue to Prevent Bone Resorption*. Symmetry-Basel, 2021. **13**(7).
181. Wang, K., et al., *Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(9): p. 1457-61.
182. Rani, P., et al., *Clinicopathological correlation of tumor-stroma ratio and inflammatory cell infiltrate with tumor grade and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in 41 cases with review of literature*. J Cancer Res Ther, 2020. **16**(3): p. 445-451.
183. Morais, E.F., et al., *Prognostic and clinicopathological significance of tumor-stroma ratio in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2022. **27**(4): p. e301-e309.
184. Choi, J.W., et al., *Intratumoural heterogeneity measured using FDG PET and MRI is associated with tumour-stroma ratio and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Radiol, 2017. **72**(6): p. 482-489.
185. Li, B., et al., *The Immune Subtypes and Landscape of Squamous Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(12): p. 3528-3537.
186. Ni, Y.H., et al., *Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients*. Tumour Biol, 2015. **36**(7): p. 5291-8.
187. Wolf, G.T., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study*. Oral Oncol, 2015. **51**(1): p. 90-5.
188. Hadler-Olsen, E. and A.M. Wirsing, *Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis*. Br J Cancer, 2019. **120**(7): p. 714-727.
189. Nguyen, N., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2016. **38**(7): p. 1074-84.
190. Taghavi, N., S. Bagheri, and A. Akbarzadeh, *Prognostic implication of CD57, CD16, and TGF-beta expression in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2016. **45**(1): p. 58-62.
191. Watanabe, Y., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010. **109**(5): p. 744-52.
192. Almangush, A., et al., *Stromal categorization in early oral tongue cancer*. Virchows Arch, 2021. **478**(5): p. 925-932.
193. Amano, Y., et al., *Clinicopathological and Prognostic Significance of Stromal Patterns in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 859144.
194. Almangush, A., et al., *Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. Br J Cancer, 2018. **118**(4): p. 577-586.
195. Attramadala, C.G., et al., *Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas*. Anticancer Res, 2015. **35**(11): p. 6111-20.

196. Ho, Y.Y., et al., *The significance of tumor budding in oral cancer survival and its relevance to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system*. Head Neck, 2019. **41**(9): p. 2991-3001.
197. Hong, K.O., et al., *Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process*. Hum Pathol, 2018. **80**: p. 123-129.
198. Kale, A.D. and P.V. Angadi, *Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects*. J Oral Maxillofac Pathol, 2019. **23**(3): p. 318-323.
199. Seki, M., et al., *Histologic assessment of tumor budding in preoperative biopsies to predict nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth*. Head Neck, 2016. **38 Suppl 1**: p. E1582-90.
200. Xie, N., et al., *Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (2016) recommendations in oral tongue squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2019. **48**(6): p. 451-458.
201. Karamitopoulou, E., *Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 209.
202. Wang, X., et al., *The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **107**(4): p. 547-54.
203. Liu, L.K., et al., *Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome*. Mod Pathol, 2010. **23**(2): p. 213-24.
204. Bello, I.O., et al., *Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue*. Hum Pathol, 2008. **39**(8): p. 1212-20.
205. Marangon Junior, H., et al., *Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2014. **43**(3): p. 199-204.
206. Yu, M., et al., *Upregulated LOX and increased collagen content associated with aggressive clinicopathological features and unfavorable outcome in oral squamous cell carcinoma*. J Cell Biochem, 2019. **120**(9): p. 14348-14359.
207. Franz, M., et al., *Mesenchymal cells contribute to the synthesis and deposition of the laminin-5 gamma2 chain in the invasive front of oral squamous cell carcinoma*. J Mol Histol, 2007. **38**(3): p. 183-90.
208. Chen, C., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2013. **338**(1): p. 47-56.
209. Zlobec, I. and A. Lugli, *Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget*. Oncotarget, 2010. **1**(7): p. 651-61.
210. Grigore, A.D., et al., *Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT*. J Clin Med, 2016. **5**(5).
211. Luo, W.R., et al., *Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma*. Histopathology, 2012. **61**(6): p. 1072-81.
212. Miyata, H., et al., *Tumor budding in tumor invasive front predicts prognosis and survival of patients with esophageal squamous cell carcinomas receiving neoadjuvant chemotherapy*. Cancer, 2009. **115**(14): p. 3324-34.
213. Masuda, R., et al., *Tumor budding is a significant indicator of a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients*. Mol Med Rep, 2012. **6**(5): p. 937-43.
214. Nakashima, C., et al., *Malic Enzyme 1 Is Associated with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinomas*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
215. Sowmya, S.V., R.S. Rao, and K. Prasad, *Pancytokeratin immunostained tumor buds and cytoplasmic pseudofragments are reliable early predictive variables for regional lymph*

- node metastatic risk assessment of oral squamous cell carcinoma.* Indian J Dent Res, 2020. **31**(6): p. 904-910.
216. Wahab, A., et al., *The budding and depth of invasion model in oral cancer: A systematic review and meta-analysis.* Oral Dis, 2020.
 217. Boxberg, M., et al., *Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system.* Histopathology, 2017. **70**(7): p. 1125-1137.
 218. Hori, Y., et al., *Predictive Significance of Tumor Depth and Budding for Late Lymph Node Metastases in Patients with Clinical N0 Early Oral Tongue Carcinoma.* Head Neck Pathol, 2017. **11**(4): p. 477-486.
 219. Xie, N., et al., *Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med, 2015. **44**(4): p. 266-72.
 220. Zhu, Y., et al., *Impact of tumor budding in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis.* Head Neck, 2019. **41**(2): p. 542-550.
 221. Dolens, E.D.S., et al., *The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis.* Front Oncol, 2021. **11**: p. 784924.
 222. Bjerkli, I.H., et al., *Tumor budding score predicts lymph node status in oral tongue squamous cell carcinoma and should be included in the pathology report.* PLoS One, 2020. **15**(9): p. e0239783.
 223. Mascitti, M., et al., *Prognostic significance of tumor budding thresholds in oral tongue squamous cell carcinoma.* Oral Dis, 2022.
 224. Silva, L., et al., *Histopathologic grading and its relationship with outcome in oral tongue squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med, 2021. **50**(2): p. 183-190.
 225. Xu, B., et al., *The prognostic role of histologic grade, worst pattern of invasion, and tumor budding in early oral tongue squamous cell carcinoma: a comparative study.* Virchows Arch, 2021. **479**(3): p. 597-606.
 226. Karjol, U., et al., *Prognostic Role of Tumor Budding in Carcinoma Tongue: A Systemic Review and Meta-Analysis.* Cureus, 2020. **12**(7): p. e9316.
 227. Elseragy, A., et al., *Emerging histopathologic markers in early-stage oral tongue cancer: A systematic review and meta-analysis.* Head Neck, 2022.
 228. Noda, Y., et al., *Novel pathological predictive factors for extranodal extension in oral squamous cell carcinoma: a retrospective cohort study based on tumor budding, desmoplastic reaction, tumor-infiltrating lymphocytes, and depth of invasion.* BMC Cancer, 2022. **22**(1): p. 402.
 229. Shimizu, S., et al., *Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion.* PLoS One, 2018. **13**(4): p. e0195451.
 230. Almangush, A., et al., *Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies.* Virchows Arch, 2018. **472**(2): p. 231-236.
 231. Joshi, P., et al., *Tumor budding - A promising prognostic histopathological parameter in oral squamous cell carcinoma - A comparative immunohistochemical study.* J Oral Maxillofac Pathol, 2020. **24**(3): p. 587.
 232. Leao, P.L.R., et al., *Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med, 2017. **46**(10): p. 949-955.
 233. Marangon Junior, H., et al., *Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 128-135.
 234. Marangon Junior, H., et al., *Immunolocalization of Cancer Stem Cells Marker ALDH1 and its Association with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma.* Head Neck Pathol, 2019. **13**(4): p. 535-542.

235. Seki-Soda, M., et al., *Histopathological changes in tumor budding between biopsy and resected specimens from patients treated with preoperative S-1 chemotherapy for oral cancer*. J Oral Pathol Med, 2019. **48**(10): p. 880-887.
236. Manjula, B.V., et al., *Prognostic and predictive factors in gingivo buccal complex squamous cell carcinoma: role of tumor budding and pattern of invasion*. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2015. **67**(Suppl 1): p. 98-104.
237. Sakata, J., et al., *Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma*. Hum Pathol, 2018. **76**: p. 1-8.
238. Yamada, S.I., et al., *Progression level of extracapsular spread and tumor budding for cervical lymph node metastasis of OSCC*. Clin Oral Investig, 2018. **22**(3): p. 1311-1318.
239. Ebihara, Y., et al., *Importance of tumor budding grade as independent prognostic factor for early tongue squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2019. **41**(6): p. 1809-1815.
240. Domingueti, C.B., et al., *Prognostication for oral carcinomas based on two histological scoring systems (BD and iBD models)*. Oral Dis, 2021. **27**(4): p. 894-899.
241. Boxberg, M., et al., *Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance*. J Clin Pathol, 2019. **72**(4): p. 285-294.
242. Pedersen, N.J., et al., *Construction of a pathological risk model of occult lymph node metastases for prognostication by semi-automated image analysis of tumor budding in early-stage oral squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(11): p. 18227-18237.
243. Leite, C.F., et al., *Can morphological features evaluated in oral cancer biopsies influence in decision-making? A preliminary study*. Pathol Res Pract, 2020. **216**(10): p. 153138.
244. Samyukta, S., et al., *An Evaluation of the Prognosticative Value of Hyalinization in the Biological Behaviour of Oral Lesions Using Image Analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2022. **23**(8): p. 2829-2834.
245. Ziober, B.L., et al., *Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2000. **36**(4): p. 365-72.
246. Kumari, K., et al., *Expression of type III collagen correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma*. J Investig Clin Dent, 2017. **8**(4).
247. Devendra, A., et al., *Histochemical analysis of collagen reorganization at the invasive front of oral squamous cell carcinoma tumors*. J Investig Clin Dent, 2018. **9**(1).
248. Bordoloi, B., et al., *A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma in oral squamous cell carcinoma using special stains and polarized microscopy*. J Oral Maxillofac Pathol, 2020. **24**(2): p. 398.
249. Kardam, P., et al., *Stromal fibers in oral squamous cell carcinoma: A possible new prognostic indicator?* J Oral Maxillofac Pathol, 2016. **20**(3): p. 405-412.
250. Manjunatha, B.S., A. Agrawal, and V. Shah, *Histopathological evaluation of collagen fibers using picosirius red stain and polarizing microscopy in oral squamous cell carcinoma*. J Cancer Res Ther, 2015. **11**(2): p. 272-6.
251. Martins, G.B., S.R. Reis, and T.M. Silva, *[Collagen type I expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity]*. Pesqui Odontol Bras, 2003. **17**(1): p. 82-8.
252. Sharma, R., et al., *Architectural Analysis of Picosirius Red Stained Collagen in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma using Polarization Microscopy*. J Clin Diagn Res, 2015. **9**(12): p. EC13-6.
253. Parikka, M., et al., *Alterations of collagen XVII expression during transformation of oral epithelium to dysplasia and carcinoma*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(7): p. 921-9.
254. Giuliani, A., et al., *Synchrotron Phase Tomography: An Emerging Imaging Method for Microvessel Detection in Engineered Bone of Craniofacial Districts*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 769.
255. Dalstra, M., P.M. Cattaneo, and F. Beckmann, *Synchrotron radiation-based microtomography of alveolar support tissues*. Orthod Craniofac Res, 2006. **9**(4): p. 199-205.

256. Iezzi, G., et al., *Jawbone remodeling: a conceptual study based on Synchrotron High-resolution Tomography*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 3777.
257. Giuliani, A., et al., *Regenerative properties of collagenated porcine bone grafts in human maxilla: demonstrative study of the kinetics by synchrotron radiation microtomography and light microscopy*. Clin Oral Investig, 2018. **22**(1): p. 505-513.
258. Giuliani, A., et al., *Polyglycolic acid-polylactic acid scaffold response to different progenitor cell in vitro cultures: a demonstrative and comparative X-ray synchrotron radiation phase-contrast microtomography study*. Tissue Eng Part C Methods, 2014. **20**(4): p. 308-16.
259. Albertini, G., et al., *Organization of extracellular matrix fibers within polyglycolic acid-polylactic acid scaffolds analyzed using X-ray synchrotron-radiation phase-contrast micro computed tomography*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. **15**(3): p. 403-11.
260. Manescu, A., et al., *Osteogenic potential of dualblocks cultured with human periodontal ligament stem cells: in vitro and synchrotron microtomography study*. J Periodontal Res, 2016. **51**(1): p. 112-24.
261. Mazzoni, S., et al., *Role of Cortico-Cancellous Heterologous Bone in Human Periodontal Ligament Stem Cell Xeno-Free Culture Studied by Synchrotron Radiation Phase-Contrast Microtomography*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).
262. Giuliani, A., et al., *Osteo-regeneration personalized for children by rapid maxillary expansion: an imaging study based on synchrotron radiation microtomography*. BMC Oral Health, 2018. **18**(1): p. 125.
263. Paino, F., et al., *Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(8): p. 699-713.
264. Nava, A., et al., *Virtual histology of archaeological human deciduous prenatal enamel through synchrotron X-ray computed microtomography images*. J Synchrotron Radiat, 2022. **29**(Pt 1): p. 247-253.
265. Giuliani, A., et al., *In vivo regenerative properties of coralline-derived (biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with Beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation x-ray microtomography*. Clin Implant Dent Relat Res, 2014. **16**(5): p. 736-50.
266. Giuliani, A., et al., *Advanced 3D Imaging of Uterine Leiomyoma's Morphology by Propagation-based Phase-Contrast Microtomography*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10580.
267. Belloni, A., et al., *Uterine leiomyoma as useful model to unveil morphometric and macromolecular collagen state and impairment in fibrotic diseases: An ex-vivo human study*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022. **1868**(12): p. 166494.
268. Cao, Y., et al., *Synchrotron radiation micro-tomography for high-resolution neurovascular network morphology investigation*. J Synchrotron Radiat, 2019. **26**(Pt 3): p. 607-618.
269. Wagner, W.L., et al., *3D analysis of microvasculature in murine liver fibrosis models using synchrotron radiation-based microtomography*. Angiogenesis, 2021. **24**(1): p. 57-65.
270. Varga, P., et al., *Investigation of the three-dimensional orientation of mineralized collagen fibrils in human lamellar bone using synchrotron X-ray phase nano-tomography*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8118-27.