



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cliniche, Specialistiche e
Odontostomatologiche

Corso di Dottorato di Ricerca in Biomedical Sciences
XXIII Ciclo

**SVILUPPO DI UN MODELLO PROGNOSTICO
MORFOLOGICO PER IL CARCINOMA
SQUAMOCELLULARE DELLA LINGUA**

Tutor: Chiar.mo
Prof. Andrea Santarelli

Tesi di Dottorato di:
Marco Mascitti

A. A. 2016 - 2020

Indice

1. Il carcinoma squamocellulare della lingua.....	p. 1
1.1. Definizione e considerazioni anatomiche.....	p. 1
1.2. Epidemiologia.....	p. 3
1.3. Fattori di rischio.....	p. 5
1.4. Caratteristiche cliniche.....	p. 11
1.5. Diagnosi.....	p. 13
1.6. Stadiazione.....	p. 14
1.7. Trattamento.....	p. 20
2. Studi prognostici nel carcinoma della lingua.....	p. 23
2.1. Generalità.....	p. 23
2.2. La prognosi nel carcinoma della lingua.....	p. 30
2.3. Fattori prognostici istopatologici nel carcinoma della lingua.....	p. 33
3. Scopo del lavoro.....	p. 42
4. Materiali e metodi.....	p. 44
4.1. Selezione dei pazienti.....	p. 44
4.2. Valutazione istopatologica.....	p. 45
4.3. Definizione degli outcome.....	p. 56
4.4. Analisi statistiche e sviluppo del modello prognostico.....	p. 56

5. Risultati.....	p. 59
5.1. Caratteristiche clinico-patologiche.....	p. 59
5.2. Analisi di correlazione.....	p. 63
5.3. Analisi di sopravvivenza.....	p. 66
5.4. Sviluppo del modello prognostico e del nomogramma.....	p. 70
6. Discussione.....	p. 72
7. Bibliografia.....	p. 85

1. Il carcinoma squamocellulare della lingua

1.1. Definizione e considerazioni anatomiche

Il carcinoma squamocellulare della lingua (*oral tongue squamous cell carcinoma*, OTSCC) è un sottotipo specifico del carcinoma orale e la principale neoplasia maligna che interessa quest'organo, originando dal suo epitelio di rivestimento. Una delle caratteristiche comuni a tutti i carcinomi è la capacità di diffondere rapidamente, infiltrando i tessuti circostanti e interessando le stazioni linfonodali loco-regionali. Per tale motivo, è necessario descrivere brevemente i principali aspetti relativi all'anatomia chirurgica della lingua, al fine di comprendere le principali caratteristiche cliniche e patologiche dell'OTSCC.

La lingua è un organo complesso, impari e mediano, costituito in gran parte da una massa di muscolatura striata rivestita da una tonaca mucosa costituita da un epitelio pavimentoso stratificato e da una lamina propria connettivale densa. Si distinguono un corpo della lingua e una radice attraverso la quale si connette ai diversi punti d'attacco ossei. Il corpo della lingua si può suddividere nella "lingua mobile" o "porzione orale della lingua" (*oral tongue*, OT), formata dai 2/3 anteriori, e nella base della lingua. Quest'ultima, strutturalmente ed embriologicamente distinta dalla porzione anteriore, costituisce il terzo posteriore ed è parte integrante dell'orofaringe [1].

Dal punto di vista strutturale la lingua è formata da uno scheletro fibroso, costituito dall'unione di due lamine fibrose (la membrana ioglossa e il setto linguale) al quale prendono attacco numerosi muscoli [2]. Questi ultimi si distinguono in muscolatura estrinseca (muscoli genioglossi, ioglossi, condroglossi, stiloglossi, palatoglossi, faringoglossi e amigdaloglossi) che originano fuori dalla lingua, e in muscolatura intrinseca (muscoli longitudinale superiore, longitudinale inferiore, trasverso e verticale) che presentano origine e inserzione nella compagine della lingua stessa [3].

La tonaca muscosa cambia notevolmente nelle diverse regioni dell'organo: in corrispondenza della superficie dorsale dell'OT essa è una mucosa specializzata, dove presenta le papille linguali e le

papille gustative. La superficie ventrale della lingua è caratterizzata da una mucosa di rivestimento non cheratinizzata e poco aderente agli strati profondi dell'organo [1].

All'interno della lingua, soprattutto nell'OT, sono presenti degli aggregati ghiandolari tubuloacinosi ramificati chiamati complessivamente "ghiandole linguali" (ghiandole anteriori, laterali, posteriori profonde e posteriori superficiali della base) [4].

La lingua è irrorata principalmente dall'arteria linguale, ramo della carotide esterna, e in misura minore dalle arterie palatina ascendente e faringea ascendente. Il drenaggio venoso avviene grazie alle vene sottolinguale, linguali profonde e dorsale, le quali confluiscono nella vena linguale [1]. Il drenaggio linfatico è condotto da una fitta rete di vasi linfatici drenati da diversi gruppi di collettori. In particolare, l'apice della lingua è drenata dai linfonodi sottomentali, la porzione centrale dell'OT è drenata da un gruppo di collettori facenti capo ai linfonodi sottomandibolari di entrambi i lati, mentre i margini laterali dell'OT sono drenati dai linfonodi sottomandibolari omolaterali [5]. È bene ricordare che dal punto di vista della chirurgia oncologica della regione testa-collo, i linfonodi sono suddivisi in specifiche regioni anatomiche e raggruppati in 7 gruppi [6]:

- Sottomentali: sottolivello IA (linfonodi all'interno di una regione delimitata dal ventre anteriore dei muscoli digastrici e dall'osso ioide);
- Sottomandibolari: sottolivello IB (linfonodi all'interno di una regione delimitata dai ventri anteriore e posteriore del digastrico, dal muscolo stiloioideo e dal corpo della mandibola);
- Giugulari superiori: sottolivelli IIA e IIB (linfonodi localizzati attorno al terzo superiore della vena giugulare interna, andando dalla base del cranio al margine inferiore dell'osso ioide);
- Giugulari medi: livello III (linfonodi localizzati attorno al terzo medio della vena giugulare interna, andando dal margine inferiore dell'osso ioide al bordo inferiore della cartilagine cricoidea);
- Giugulari inferiori: livello IV (linfonodi localizzati attorno al terzo inferiore della vena giugulare interna, andando dal margine inferiore della cartilagine cricoidea alla clavicola);

- Gruppo del triangolo posteriore: sottolivelli VA e VB (linfonodi localizzati in una regione delimitata dai muscoli sternocleidomastoideo e trapezio, e inferiormente dalla clavicola);
- Gruppo del compartimento anteriore: livello VI (linfonodi pretracheali, paratracheali e pretiroidei, inclusi quelli attorno al decorso del nervo laringeo ricorrente);
- Gruppo mediastinico superiore: livello VII (linfonodi pretracheali, paratracheali ed esofagei).

Infine, una considerazione a parte va fatta per i linfonodi linguali, un gruppo incostante di 1-3 linfonodi localizzati tra i fasci muscolari del corpo della lingua, nei pressi della ghiandola sottolinguale, e presenti solo nel 15-30% dei soggetti [7].

1.2. Epidemiologia

L'OTSCC è la più comune neoplasia maligna del cavo orale e una delle più frequenti della regione testa-collo, rappresentando circa l'1% di tutti i tumori diagnosticati [8]. I dati epidemiologici attualmente a disposizione indicano come l'incidenza dell'OTSCC sia considerevolmente variabile tra i vari Paesi, con un range che va dagli 1,1 casi per 100.000 all'anno in Gran Bretagna ai 9,4 casi per 100.000 all'anno in India [9, 10].

Il dato più allarmante riguarda l'andamento epidemiologico di questa neoplasia: diversi studi hanno evidenziato il progressivo aumento dell'incidenza dell'OTSCC negli ultimi 40 anni, in particolar modo a partire dagli anni '90 [11]. Nello specifico, l'incidenza dell'OTSCC negli Stati Uniti d'America è aumentata di circa l'1% all'anno dal 1973 al 2010. In particolare, i dati provenienti dal database "Surveillance, Epidemiology, and End Results" (SEER) evidenziano come l'aumento dell'incidenza interessi maggiormente l'uomo (1,2%) rispetto alla donna (0,5%) e i soggetti con meno di 45 anni (1,6%) rispetto a quelli più anziani (0,9%) [10]. Questo dato contrasta con quello dei tumori delle altre regioni del cavo orale, che hanno visto una stabilizzazione o addirittura una progressiva riduzione nel corso degli anni [10, 12].

L'OTSCC colpisce prevalentemente gli uomini, con un picco di incidenza tra la VI e l'VIII decade di vita, mentre risulta estremamente raro nei soggetti al di sotto dei 20 anni. Alla luce di quanto detto, risulta particolarmente allarmante il costante aumento del numero dei casi di OTSCC tra i soggetti giovani, in particolare tra coloro che hanno meno di 40 anni. È necessario sottolineare che i dati riguardanti la prevalenza dell'OTSCC variano considerevolmente tra le varie regioni del mondo, sia a causa dell'impatto che possono avere i fattori socio-sanitari ed economici sia per motivi più strettamente metodologici, legati soprattutto alle metodiche di raccolta dei dati e di campionamento [13]. I primi indizi di una tendenza all'aumento di incidenza del carcinoma orale nei giovani risalgono agli inizi degli anni '90; tali risultati sono poi stati confermati da numerosi studi condotti in Europa e negli Stati Uniti d'America [14]. Tale aumento è essenzialmente legato all'incremento degli OTSCC, i quali rappresentano fino all'80% dei casi di carcinoma orale nei soggetti giovani. Infatti, rispetto ad altri distretti del cavo orale, la porzione orale della lingua è proporzionalmente molto più colpita dal carcinoma nei soggetti giovani [15]. Questo andamento è stato riscontrato più recentemente anche in numerosi Paesi extraeuropei, sia industrializzati che in via di sviluppo, dando a questo fenomeno di "transizione demografica" una portata globale [11]. Ad oggi l'aumento annuale di incidenza dell'OTSCC oscilla, a seconda del Paese considerato, dallo 0,4% al 3,3% nei soggetti con meno di 45 anni [16]. L'elevata proporzione di casi di OTSCC rispetto ad altri distretti del cavo orale nei soggetti con meno di 40 anni è stata confermata da numerosi studi multicentrici. Le caratteristiche di questa specifica coorte è di avere un maggior numero di donne e una minore esposizione a fumo di tabacco ed alcool. A titolo d'esempio, in Australia l'andamento dell'incidenza dell'OTSCC nelle giovani donne è aumentato del 385% nel corso degli ultimi 30 anni [11].

L'incidenza degli OTSCC è maggiore negli uomini rispetto alle donne, analogamente all'andamento epidemiologico del carcinoma orale. Il motivo principale risiede nella maggiore esposizione ai principali fattori di rischio, quali l'abuso di sostanze alcoliche e il fumo di sigaretta. Ciononostante, l'incidenza dell'OTSCC nelle donne è in aumento in alcuni Paesi, suggerendo come, oltre ai

tradizionali fattori di rischio, anche altre condizioni possano giocare un ruolo nell'insorgenza di questo tumore [17].

Un recente studio ha mostrato come non sembrano sussistere differenze significative riguardo al rischio d'insorgenza di questo tumore in base all'ambiente in cui si vive, sia esso urbano, suburbano o rurale. Al contrario, la variabilità etnica sembra concorrere almeno in parte all'andamento epidemiologico. In particolare, l'incidenza dell'OTSCC cresce più velocemente nelle giovani donne di etnia caucasiche, sottolineando la necessità di studi epidemiologici più mirati su certi sottogruppi della popolazione [18].

Riguardo alla mortalità da OTSCC, i dati a disposizione sembrano allinearsi a quelli del carcinoma orale. In particolare, nella maggioranza dei Paesi europei la mortalità per OTSCC negli uomini ha mostrato un sensibile aumento a partire dagli anni '50, per poi raggiungere il livello massimo alla fine degli anni '80 e ridursi lievemente all'inizio degli anni 2000 [19]. Per quanto riguarda le donne, i tassi di mortalità sono più bassi ma moderatamente crescenti nei Paesi industrializzati [19].

1.3. Fattori di rischio

È bene ricordare che la maggior parte dei dati disponibili riguardano il carcinoma orale nel suo complesso, senza ulteriori suddivisioni in base alle sottosesti. Il fumo di tabacco e l'abuso di bevande alcoliche sono i principali fattori di rischio per l'insorgenza dell'OTSCC, responsabili di circa l'80% di queste neoplasie. Analogamente al carcinoma orale, esistono ulteriori fattori di rischio che possono intervenire nella genesi di questa neoplasia, come alcune carenze nutrizionali, la scarsa igiene orale, i traumatismi orali cronici e la predisposizione genetica. È necessario ricordare però che per questi ulteriori fattori di rischio le prove riguardanti la correlazione con l'OTSCC sono ancora indiziali e non confermate in maniera inequivocabile.

1.3.1. Fumo di tabacco

Il fumo di tabacco rappresenta il principale fattore di rischio indipendente per lo sviluppo dell'OTSCC. È stato stimato infatti che circa l'80% dei soggetti affetti da questo tumore sono o erano fumatori e che il rischio di sviluppare l'OTSCC è da 5 a 9 volte maggiore nei fumatori rispetto ai non fumatori [20]. Come per il carcinoma orale, tale rischio appare essere dose-dipendente, aumentando proporzionalmente al numero di sigarette fumate [21]. L'azione cancerogena del tabacco è dovuta alla presenza di più di 60 composti e prodotti della combustione, quali: gli idrocarburi aromatici policiclici (in particolare il benzopirene e il benzoantracene), le nitrosamine tabacco-specifiche (come la N-nitroso-nor-nicotina, la N nitrosodimetilamine, la N-nitrosopirrolidina, ecc.), le amine aromatiche (la 2-toluidina, la 2-6-dimetilalanina, la 2-naftalina, ecc.), aldeidi (in particolare la formaldeide e l'acetaldeide), i composti fenolici, gli idrocarburi volatili, i composti organici, i metalli pesanti e i radioisotopi [22]. L'irritazione termica diretta sulla mucosa orale è un probabile cofattore, come dimostrato dal fatto che l'abitudine di fumare sigarette con l'estremità accesa posta all'interno del cavo orale (il "reverse smoking"), è correlata ad un rischio ancora maggiore di sviluppare il carcinoma orale [23]. Infine, l'usanza di masticare abitualmente il quid (o paan), diffusa sia nel subcontinente indiano che nel Sud-Est asiatico, può indurre la degenerazione della mucosa orale e un aumentato rischio di sviluppare un carcinoma squamocellulare [24].

1.3.2. Alcol

L'eccessivo consumo di alcol rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale. In particolare, un consumo quotidiano superiore a 10 g di alcol è responsabile di numerosi effetti negativi sulla salute dell'individuo [25].

Diversi studi condotti negli anni '80 hanno portato a riconoscere in modo inequivocabile gli effetti cancerogeni dell'alcol sul rischio di sviluppare il carcinoma orale [26]. Numerose pubblicazioni

hanno successivamente confermato questi dati, evidenziando come l'alcol rappresenti un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza dell'OTSCC. Inoltre, il rischio relativo attribuito all'alcol è dose-dipendente: ciò significa che il rischio di sviluppare l'OTSCC aumenta contestualmente alla quantità di alcol consumato e sembra ridursi solamente dopo un periodo di almeno 10 anni dalla cessazione del suo consumo [27]. Il ruolo svolto dall'alcol nella cancerogenesi della lingua appare sinergico a quello del tabacco, con un effetto moltiplicativo sul rischio. Infatti, il rischio di sviluppare l'OTSCC nei forti fumatori e forti bevitori è risultato più di 10 volte maggiore di quello atteso in base all'effetto indipendente delle stesse quantità di tabacco ed alcol assunti da soli [28].

Studi sperimentali hanno dimostrato che l'azione cancerogena delle bevande alcoliche a carico del cavo orale, sarebbe dovuta principalmente a meccanismi indiretti [29]. In particolare, l'alcol potrebbe potenziare l'azione di altre sostanze cancerogene, fungendo da solvente o aumentandone l'assorbimento a seguito dell'aumento della permeabilità della mucosa orale [29]. L'azione cancerogena diretta dell'alcol potrebbe dipendere dall'azione dell'acetaldeide, il metabolita primario dell'etanolo. Inoltre, l'eventuale presenza di additivi e contaminanti all'interno delle bevande alcoliche potrebbe aumentare il potere oncogeno dell'alcol [30].

1.3.3. Altri fattori di rischio

Tra gli agenti infettivi maggiormente studiati nell'ambito dell'oncologia orale c'è il papillomavirus umano (*Human Papilloma Virus*, HPV), un insieme di virus appartenenti alla famiglia dei Papillomaviridae già noti per essere associati al carcinoma della cervice uterina [31]. La possibile associazione tra l'infezione da HPV e l'insorgenza del carcinoma orale fu ipotizzata per la prima volta negli anni '80 [32]. L'HPV, in particolare i genotipi ad alto rischio, è oggi considerato come una delle possibili cause del carcinoma orofaringeo, soprattutto in soggetti giovani non fumatori e non bevitori. Per quanto riguarda il cavo orale, alcune analogie tra le caratteristiche epidemiologiche dell'OTSCC e quelle del carcinoma orofaringeo hanno fatto sospettare un'eziologia comune [33].

Ciononostante, i numerosi studi condotti finora non sono riusciti a dimostrare una relazione tra l'aumento dell'incidenza dell'OTSCC e l'HPV, alla luce del fatto che la prevalenza di infezione da HPV in questo tipo di neoplasie è molto bassa, attestandosi attorno al 6,5% [34]. Per quanto riguarda gli altri virus oncogeni ad oggi noti, nessuno di essi ha dimostrato di avere un ruolo diretto nello sviluppo dell'OTSCC.

Diversi lavori hanno dimostrato che una dieta con carenze nutrizionali è significativamente associata ad un aumentato rischio di sviluppare tumori nel distretto testa-collo [35, 36]. A conferma di ciò sono state condotte diverse indagini epidemiologiche, le quali hanno evidenziato come esista una riduzione del rischio di insorgenza dell'OTSCC, e più in generale del carcinoma orale, correlata all'aumento del consumo di frutta e verdura [37, 38]. Questo sembra essere legato alla presenza di alcuni micronutrienti principalmente coinvolti nella protezione dallo sviluppo di neoplasie epiteliali, in particolare la vitamina A ed i relativi carotenoidi, la vitamina C e la vitamina E. Importante è anche un'adeguata assunzione di ferro la cui carenza può determinare un'atrofia dell'epitelio orale, in particolare della porzione orale della lingua, esponendolo maggiormente all'azione degli agenti cancerogeni, con conseguente aumento del rischio di trasformazione neoplastica [39].

La maggiore predisposizione a sviluppare un OTSCC, soprattutto in età giovane, potrebbe essere correlata alla presenza di una predisposizione genetica, in particolare ad alterazioni genetiche coinvolgenti i sistemi di riparazione del DNA o di regolazione della proliferazione cellulare [40]. A corroborare tale ipotesi, esistono delle condizioni genetiche ereditarie che possono predisporre all'insorgenza dell'OTSCC, e più in generale dei tumori della regione testa-collo, come: l'anemia di Fanconi, lo xeroderma pigmentosum, la sindrome di Bloom, la sindrome di Li-Fraumeni e l'ataxia-teleangiectasia. In tutte queste patologie il rischio di sviluppare un OTSCC risulta aumentato anche di 700-1000 volte rispetto alla popolazione generale [16]. Pertanto è possibile che, anche in assenza di specifiche condizioni sindromiche, possa esistere un'aumentata suscettibilità genetica all'OTSCC.

Strettamente collegata alla predisposizione genetica, anche l'anamnesi familiare è considerata un importante fattore di rischio per diversi tumori. Alcuni studi hanno suggerito la presenza di una

tendenza analoga per quanto riguarda l'OTSCC, sebbene le evidenze scientifiche in tal senso siano molto scarse. In particolare, i soggetti con anamnesi familiare positiva per l'OTSCC, o più in generale per il carcinoma orale, sembrano avere un rischio 2-3 volte superiore di sviluppare questa neoplasia [41, 42]. Questa tendenza potrebbe essere dovuta ad un'influenza esercitata da determinati fattori genetici su altri fattori di rischio, come il fumo di tabacco [43], e non come una diretta predisposizione alla trasformazione neoplastica della mucosa orale. Pertanto, la predisposizione genetica a sviluppare un OTSCC potrebbe essere semplicemente dovuta a una maggiore suscettibilità all'azione mutagena di sostanze cancerogene.

1.3.4. Fattori di rischio associati all'OTSCC nei giovani

Come già discusso, il preoccupante aumento dei casi di OTSCC tra le persone con meno di 40 anni ha spinto ad indagare questo fenomeno ma, nonostante gli sforzi, le cause sottostanti a questo aumento di casi sono ancora sconosciute [44].

Fin dagli anni '80 numerosi studi hanno investigato sull'associazione tra il consumo di tabacco e l'insorgenza dell'OTSCC nei soggetti giovani. Sebbene i risultati riportati in letteratura siano difficilmente confrontabili, il primo dato che emerge è il minor utilizzo di tabacco da parte delle generazioni più giovani. Infatti, solo la metà dei casi di OTSCC sono associati ad un moderato consumo di tabacco, mentre i forti fumatori rappresentano meno del 10% dei casi totali [45]. Negli ultimi anni il consumo di sigarette è diventato meno frequente tra i giovani, soprattutto in alcuni Paesi come gli Stati Uniti d'America e tra i soggetti di sesso maschile [46]. Alcuni studi indicano addirittura che i giovani affetti da OTSCC sono più frequentemente non fumatori [47, 48].

Risultati analoghi emergono dall'associazione tra consumo di alcol e insorgenza dell'OTSCC. Ancor più rispetto al fumo di tabacco, l'estrema eterogeneità degli studi condotti su questo argomento, in particolare riguardo alla categorizzazione del consumo di alcol, rende molto difficile trarre delle

conclusioni definitive. In particolare, sembra che l'alcol abbia un'influenza molto limitata sull'insorgenza dell'OTSCC [48, 49].

Di conseguenza i due principali fattori di rischio per l'OTSCC non sembrano avere un ruolo preponderante nei soggetti giovani, sia per la loro minor diffusione tra la popolazione che per un minor tempo di esposizione. Infatti, alcuni ricercatori hanno ipotizzato che la durata dell'esposizione alle sostanze cancerogene presenti nel fumo e nell'alcol nei giovani potrebbe non essere sufficiente per determinare la comparsa di un OTSCC [50].

L'HPV è oggi considerato come una delle possibili cause del carcinoma orofaringeo, soprattutto in soggetti giovani non fumatori e non bevitori [51]. Infatti, il carcinoma orofaringeo correlato a HPV è un'entità nosologica che si è andata sempre più delineando negli ultimi anni, in associazione con i genotipi ad alto rischio dell'HPV (16, 18, 31 e 33) [52].

Alcune analogie tra le caratteristiche epidemiologiche dell'OTSCC e quelle del carcinoma orofaringeo hanno fatto sospettare un'eziologia comune. Infatti, l'incidenza di entrambe le neoplasie, soprattutto nei giovani, è in costante aumento, mentre gli altri tumori della regione testa-collo hanno visto una progressiva stabilizzazione o addirittura una riduzione nel corso degli anni [34].

Nonostante numerosi studi abbiano ipotizzato che l'HPV potesse essere un agente eziologico, non esistono evidenze scientifiche che dimostrino una relazione tra l'aumento dell'incidenza dell'OTSCC e l'HPV, alla luce del fatto che la prevalenza di infezione da HPV in questo tipo di neoplasie è molto bassa, attestandosi attorno al 6,5% [34, 44]. Ciononostante, tenendo conto delle attuali modalità di rilevamento dell'HPV, non si può escludere che alcuni genotipi di HPV meno frequenti possano essere coinvolti nella genesi degli OTSCC, sebbene allo stato attuale ciò rimanga solo una speculazione.

Infine, nonostante gli sforzi, gli studi condotti finora non hanno fatto emergere alcuna evidenza scientifica convincente riguardo il ruolo di altri possibili fattori di rischio nell'insorgenza dell'OTSCC nei soggetti giovani [44]. Perciò sono necessari ulteriori studi allo scopo di isolare quei fattori responsabili dell'insorgenza dell'OTSCC in questo specifico gruppo di pazienti.

1.4. Caratteristiche cliniche

L'OTSCC si può presentare clinicamente come una massa esofitica (vegetante o verrucosa), una lesione endofitica (nodulare o infiltrante), ulcerata o mista (Figura 1). L'aspetto esofitico è caratterizzato da una escrescenza rilevata di colore biancastro o bianco-roseo. La forma endofitica di tipo nodulare si presenta come un nodulo di consistenza dura, spesso adeso ai piani muscolari profondi e sovrastato da mucosa apparentemente integra. La forma endofitica di tipo infiltrante determina invece un indurimento diffuso e mal delimitabile dell'area affetta. Infine, la forma ulcerata si presenta come una ulcerazione dai bordi irregolari e induriti, con una sintomatologia algica scarsa o assente e mancata tendenza alla guarigione spontanea, spesso associata a sanguinamento o ricoperta da tessuto necrotico [53]. A prescindere dalla morfologia, l'OTSCC, e più in generale in carcinoma orale, può essere preceduto e/o associato alla presenza di disordini potenzialmente maligni, in particolare la leucoplachia e l'eritroplachia [54].

Il sito più comunemente colpito è il bordo laterale della lingua, in particolare il terzo medio, rappresentando più dei 2/3 dei casi. In ordine decrescente di frequenza, le altre sedi dell'OTSCC sono la superficie ventale, il dorso linguale e l'apice della lingua. Questi tumori mostrano un comportamento clinico tipicamente aggressivo, in parte legato al fatto che il distretto anatomico colpito non presenta barriere anatomiche efficaci a contrastare la diffusione tumorale. Le uniche eccezioni in tal senso sono le fasce muscolari della muscolatura estrinseca e il rafe mediano, che determinano un'azione di barriera all'infiltrazione tumorale, confinando negli stadi iniziali l'OTSCC nell'emilingua [55].

Al momento della diagnosi l'OTSCC ha solitamente una dimensione attorno ai 2 cm di diametro, sebbene non siano rari i casi in stadio avanzato caratterizzati da un'estesa infiltrazione dell'organo. In questi ultimi casi è comune la comparsa di una sintomatologia associata, come il senso di discomfort, il dolore, l'alterazione della salivazione o addirittura la comparsa di sanguinamento spontaneo [54]. Il dolore è il sintomo più comune, presentandosi nel 20% dei casi come primo

sintomo, che conduce spesso il paziente a consultare uno specialista. La distribuzione e l'intensità del dolore possono essere molto variabili e sono solitamente associate ad un certo grado di infiltrazione nervosa della neoplasia [56]. Le lesioni in stadio avanzato comportano l'infiltrazione profonda della muscolatura provocando la deviazione laterale della lingua e la limitazione dei suoi movimenti, con conseguente compromissione dell'eloquio. Altri sintomi meno comuni come la disfagia e l'otalgia sono solitamente associati al coinvolgimento della base della lingua a livello orofaringeo. In particolare l'otalgia, sebbene sia un sintomo poco frequente, nel contesto del carcinoma orale è associata quasi esclusivamente alla presenza di un OTSCC infiltrante [57].

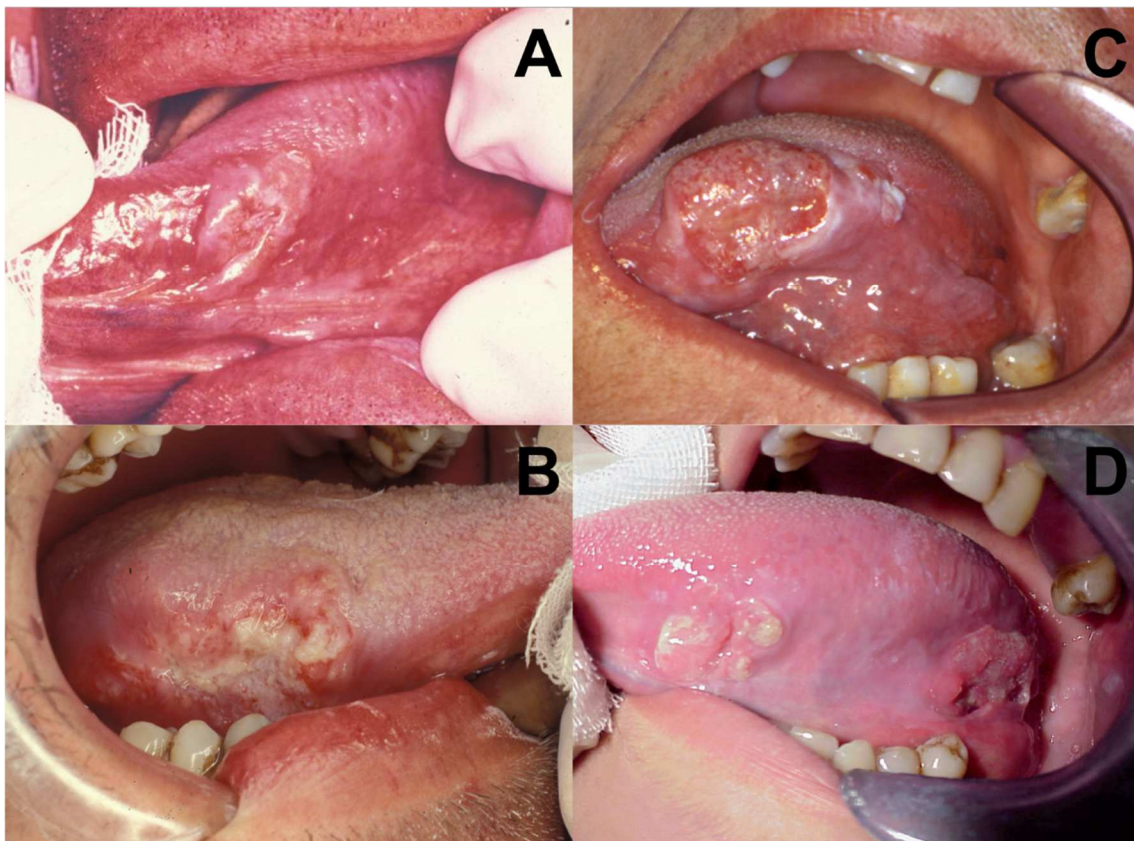


Figura 1. Immagini cliniche esemplificative di OTSCC.

L'OTSCC ha una spiccata tendenza, maggiore rispetto alle altre sedi del cavo orale, a sviluppare metastasi a livello dei linfonodi loco-regionali. In caso di coinvolgimento linfonodale, i livelli più comunemente interessati sono il I e il II [58, 59]. È bene sottolineare come la progressione metastatica

dai linfonodi superiori a quelli inferiori non sia sempre ordinatamente progressiva in quanto è frequente il riscontro delle cosiddette “metastasi a salto” (*skip metastases*) [60].

Analogamente agli altri sottotipi di carcinoma orale, le metastasi a distanza sono infrequenti ma possibili, riscontrandosi in meno del 10% dei pazienti. Esse riguardano prevalentemente il polmone, mentre le localizzazioni epatica, ossea e cerebrale sono meno frequenti [61]. Nel caso degli OTSCC i tumori cosiddetti “secondi primitivi”, cioè altre neoplasie comparse *ex novo* successivamente al primo tumore e quindi non considerabili come recidive, possono essere sincroni (se comparsi nello stesso momento) o metacroni (a distanza di tempo, solitamente entro i primi 2 anni) e sono più frequenti nel caso dei carcinomi della lingua e del pavimento del cavo orale [62].

1.5. Diagnosi

Gli step fondamentali per una corretta diagnosi dell’OTSCC, e più in generale del carcinoma orale, sono un’accurata anamnesi, l’esame obiettivo seguito dalla biopsia per validare il sospetto diagnostico e gli esami strumentali per poter accertare sia l’estensione locale che l’eventuale diffusione a distanza. In presenza di una lesione sospetta a livello dell’OT va indagata in sede anamnestica l’eventuale presenza di fattori di rischio per il carcinoma (si veda il Capitolo 1.4.), in particolare il fumo di tabacco e l’assunzione di alcol. Particolare attenzione deve essere posta a segni e sintomi riferiti dal paziente che possano far sospettare la presenza di una lesione neoplastica, quali [63]:

1. Una lesione persistente che aumenta improvvisamente di dimensione;
2. Un’ulcera che non tende a guarire;
3. Alterazione della sensibilità generale (parestesia, ipoestesia) o speciale (disgeusia);
4. Senso di discomfort o dolore;
5. Comparsa di sanguinamento spontaneo;
6. Alterazione della deglutizione o dell’eloquio.

L'esame obiettivo della lingua si basa sia sull'ispezione che sulla palpazione. L'ispezione permette di formulare un primo sospetto diagnostico indagando lo stato della mucosa linguale, con particolare attenzione al colore e alla presenza di fissurazioni, masse o ulcerazioni. La palpazione permette di valutare la consistenza della lesione e del tessuto peri-lesionale, la mobilità della lesione rispetto ai piani superficiali e profondi e l'eventuale presenza di infiltrazione. A causa della fitta rete di vasi linfatici presente nella lingua e della frequente diffusione linfatica dell'OTSCC, è fondamentale eseguire un esame obiettivo extraorale a livello della regione del collo, alla ricerca di eventuali masse linfonodali sospette [64]. L'esame obiettivo dovrà essere completato da un prelievo bioptico della lesione, rappresentando l'elemento cruciale per la diagnosi definitiva da parte dell'anatomopatologo. L'iter diagnostico prevede l'esecuzione degli esami strumentali per meglio definire l'estensione locoregionale e a distanza della lesione sospetta. Le principali tecniche di imaging sono: l'ecografia delle catene linfonodali del collo, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM). Negli ultimi anni è aumentato l'impiego della tomografia ad emissione di positroni (PET) per l'OTSCC e più in generale per i tumori della regione testa-collo, in particolare sia per valutare l'estensione della malattia a distanza e che come ausilio alla stadiazione [65, 66].

1.6. Stadiazione

La stadiazione tumorale rappresenta un passaggio fondamentale nell'iter diagnostico-terapeutico dell'OTSCC, in quanto ha lo scopo di descrivere in maniera schematica e riproducibile sia la dimensione del tumore che la sua estensione rispetto alla sede originale di sviluppo.

La stadiazione dei tumori maligni utilizza la classificazione TNM, ideato a metà del secolo scorso e periodicamente aggiornato dall'Union for International Cancer Control (UICC) e dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) [51]. Tale sistema è basato sulla valutazione di tre aspetti intrinseci della neoplasia: lo spessore del tumore primitivo (T), la presenza o meno di metastasi a livello dei linfonodi loco-regionali (N) e la presenza o meno di metastasi a distanza (M). Riguardo al calcolo del

parametro T va evidenziato come debba essere valutata anche la profondità d'invasione (*depth of invasion*, DOI). La classificazione clinica del carcinoma orale, e più in particolare dell'OTSCC, è indicata con la sigla cTNM ed è basata sui dati raccolti attraverso l'esame obiettivo e le tecniche di diagnostica per immagini. A questa classificazione si associa in un secondo momento quella patologica (pTNM), a seguito dell'esame istopatologico condotto sul tumore primitivo e sui linfonodi latero-cervicali dopo l'asportazione tramite trattamento chirurgico [51]. L'importanza dell'impiego a livello internazionale del sistema TNM risiede nella possibilità di fornire delle indicazioni prognostiche e terapeutiche che siano valide per tutti.

1.6.1. Classificazione clinica (cT) e patologica (pT) del tumore primitivo

Il parametro cT viene valutato inizialmente mediante l'esame obiettivo, seguito dallo studio mediante imaging (Tabella 1). La diagnostica per immagini, condotta principalmente per mezzo di TC o RM, permette una valutazione eccellente della lingua e delle strutture viciniori, sebbene la RM possa offrire maggior sensibilità nell'individuare un eventuale interessamento dei tessuti molli, oltre che quello di poter valutare la diffusione tumorale perineurale [67]. L'esecuzione della biopsia è necessaria per confermare la diagnosi ed è eseguita a livello della sede del tumore primitivo, mentre la biopsia linfonodale, quando indicata, è eseguita mediante agobiopsia. Nella definizione del parametro pT vanno considerate le stesse caratteristiche della classificazione clinica, valutate dal patologo mediante esame microscopico. Va notato come il parametro pT viene dato dalla misurazione del campione chirurgico prima della fissazione del pezzo in formalina, poiché il trattamento con formalina comporta una contrazione del tessuto fino al 30% [68].

Tabella 1. Classificazione clinica e patologica del tumore primitivo (cT, pT).

Categoria T	Criteri
TX	Non è possibile individuare il tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ (il tumore non ha superato la membrana basale)
T1	Tumore con spessore ≤ 2 cm, con un DOI ≤ 5 mm
T2	Tumore ≤ 2 cm, con un DOI > 5 mm ma ≤ 10 mm Tumore > 2 cm ma ≤ 4 cm, con un DOI ≤ 10 mm
T3	Tumore > 4 cm; oppure un DOI > 10 mm
T4	Tumore primitivo in stadio avanzato
T4a	Tumore che invade le strutture anatomiche adiacenti (es. la corticale ossea).
T4b	<i>Cavo orale:</i> tumore che invade lo spazio masticatorio, le lamine pterigoidee, la base cranica o la carotide interna.

1.6.2. Classificazione clinica (cN) e patologica (pN) delle metastasi linfonodali

Deve essere condotta un'accurata valutazione dei linfonodi coinvolti a livello del collo mediante esame obiettivo e tecniche di imaging, volta a stabilire il parametro cN sulla base del numero, delle dimensioni, della localizzazione, della mobilità o della fissità rispetto ai piani profondi, della forma e della consistenza (Tabella 2). È importante definire la localizzazione dei linfonodi coinvolti in base alla posizione del tumore primitivo: il coinvolgimento linfonodale può essere ipsilaterale, controlaterale o bilaterale [69]. La presenza di fissità linfonodale rispetto ai piani profondi, eventualmente coinvolgente la cute sovrastante, dovrebbe porre il sospetto di estensione extranodale (*extranodal extension*, ENE). Riguardo quest'ultimo aspetto, è importante sottolineare come ad oggi l'esame obiettivo rappresenti il metodo più affidabile per stabilire clinicamente la presenza o meno di coinvolgimento extranodale della metastasi linfonodale, poiché le tecniche di radiodiagnostica attualmente impiegate nella pratica clinica tendono a sovrastimare questo parametro. Per la

valutazione del parametro pN è necessario che l'esame istologico comprenda un numero minimo di linfonodi (Tabella 3). Nello specifico, il criterio minimo affinché un campione possa essere definito libero da metastasi linfonodali (pN0) è che vengano esaminati e riscontrati esenti da metastasi almeno 10 linfonodi da un intervento di dissezione selettiva del collo oppure almeno 15 linfonodi in caso di dissezione radicale del collo. Ciononostante, anche in caso di un esame che comprenda un numero inferiore di linfonodi esaminati, in caso di linfonodi negativi deve essere riportato il valore pN0 [51].

Tabella 2. Classificazione clinica delle metastasi linfonodali (cN).

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

Tabella 3. Classificazione patologica delle metastasi linfonodali (pN).

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

1.6.3. Classificazione clinica (cM) e patologica (pM) delle metastasi a distanza

In assenza di sintomi che facciano sospettare la presenza di metastasi a distanza, le procedure diagnostiche minime da effettuare sono una radiografia del torace e un'ecografia epatica, sebbene la PET/TC sia l'unica metodica che permette un'indagine completa dell'intero corpo. Per quanto riguarda la stadiazione dell'OTSCC, viene considerata positiva (pM1) solo quella metastasi individuata tramite imaging (cM1) e sottoposta ad esame biotico (Tabella 4) [51].

Tabella 4. Classificazione clinica e patologica delle metastasi a distanza (cM, pM).

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

1.6.4. Raggruppamento in stadi prognostici

Una volta assegnati i diversi valori ai parametri T, N e M, questi vengono raggruppati in vari stadi al fine di definire una stratificazione prognostica dell'OTSCC (Tabella 5).

Tabella 5. Raggruppamento in stadi prognostici

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

1.7. Trattamento

La chirurgia e la radioterapia sono le due modalità terapeutiche principali nel trattamento loco-regionale dell'OTSCC, potendo anche essere usate in associazione. Inoltre, per i tumori in fase iniziale a livello dell'OT, e più in generale del cavo orale, sussiste l'indicazione all'impiego della brachiterapia interstiziale, sebbene ancora oggi sia scarsamente impiegata [70].

Un intervento pianificato di chirurgia oncologica ha lo scopo di rimuovere il tumore con un congruo margine di tessuto normale, massimizzando la probabilità di ottenere margini liberi da malattia e di conseguenza di riducendo al minimo la necessità di ulteriori terapie. Un problema legato all'OTSCC è la capacità di crescere rapidamente verso i piani profondi, dove la presenza della componente muscolare comporta la costante spremitura delle cellule tumorali con conseguente effetto squeezing, cioè la presenza di focolai neoplastici separati dalla massa principale [3]. Questo può determinare la presenza di un margine tumorale mal definito, con la conseguente difficoltà per l'operatore ad ottenere la radicalità chirurgica.

Per le neoplasie localizzate presso l'OT ad estensione limitata (T1) e intermedia (T2), il trattamento d'elezione è la chirurgia. Qualora all'esame istologico estemporaneo del pezzo operatorio i margini della lesione risultino interessati, è obbligatoria una radicalizzazione chirurgica con estensione dei margini. Per i tumori in stadio avanzato (T3-T4) la chirurgia è il trattamento di scelta, poiché è quello che garantisce le possibilità di cura maggiori, sebbene nella maggior parte dei casi esso dovrà essere seguito da un protocollo radioterapico post-operatorio, con o senza chemioterapia concomitante [71].

La radioterapia da sola può essere impiegata come valida alternativa alla chirurgia nei casi di tumori precoci in quei pazienti in cui la chirurgia comporterebbe una severa disabilità o in cui la radicalità chirurgica sarebbe difficile da ottenere [55].

Il trattamento chirurgico del collo è indicato nei pazienti clinicamente positivi (cN1-3); in particolare, in caso di una stadiazione N1, la dissezione del collo sembra sufficiente, mentre per i casi più avanzati è auspicabile un protocollo radioterapico post-operatorio [72]. Più complesso appare l'iter terapeutico

nel caso di una stadiazione N0. Infatti, il trattamento del collo clinicamente negativo nel paziente affetto da carcinoma orale dipende da numerosi fattori, tra i quali la sede d'insorgenza del tumore primitivo. Per quanto riguarda l'OTSCC, il trattamento chirurgico elettivo del collo clinicamente negativo (cN0) negli stadi precoci (T1-T2) è un argomento oggetto di dibattito in letteratura da molti anni [73]. Alcuni autori propongono per questi casi la strategia del "wait and see", evidenziando il rischio di overtreatment e i discomfort collegati all'intervento [74]. Al contrario, diversi studi hanno proposto una dissezione elettiva del collo contestualmente all'intervento del tumore primitivo, sottolineando come in questo modo si asporterebbero tutte le micrometastasi eventualmente presenti, abbattendo il rischio di recidiva regionale [75, 76]. Infatti, la frequenza delle metastasi subcliniche negli OTSCC precoci è tutt'altro che trascurabile, oscillando tra l'8,6% e il 46,3% a seconda degli studi considerati [77].

Allo stato attuale la valutazione anatomopatologica legata alla dissezione del collo rimane il gold standard dal punto di vista dell'accuratezza diagnostica e non esistono tecniche di imaging o biotiche capaci di sostituirla. Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi al fine di valutare l'affidabilità della biopsia del linfonodo sentinella. In particolare, la tecnica sembra essere affidabile nella stadiazione del collo N0 in pazienti con carcinomi orali precoci (T1-T2) [78], sebbene ad oggi sono ancora necessarie ulteriori conferme. Una recente metanalisi ha evidenziato come la dissezione elettiva del collo riduca significativamente il rischio di recidiva e migliori la sopravvivenza da malattia, sebbene non sembri influenzare significativamente la sopravvivenza globale [77].

Riguardo alla chemioterapia, ad oggi il suo impiego è limitato ai tumori in stadio avanzato e non operabili, in associazione alla radioterapia. La combinazione di chemioterapia e radioterapia è impiegata quasi esclusivamente negli pazienti con tumori in stadio avanzato e con un buon performance status, poiché l'uso concomitante di entrambe le modalità è gravato da una maggiore tossicità acuta e cronica [79]. Alcuni studi hanno valutato l'utilità della chemioterapia pre-operatoria nell'OTSCC, non facendo emergere alcun vantaggio significativo in termini di sopravvivenza globale.

Le limitazioni delle terapie convenzionali ed il progredire delle conoscenze hanno spinto ad indagare nuove modalità terapeutiche per l'OTSCC, prima fra tutte la terapia mirata (*targeted therapy*) mediante la somministrazione di farmaci biologici, i quali vanno ad interferire con specifici pathway molecolari coinvolti nella crescita e diffusione tumorale. Il primo farmaco di questo genere ad essere approvato per il tumori della regione testa-collo è stato il Cetuximab nel 2006 [80, 81]. Nonostante le potenzialità di questo nuovo approccio terapeutico, ad oggi i farmaci biologici sono indicati solo come alternativa alla chemioterapia convenzionale negli OTSCC di stadio avanzato.

2. Studi prognostici nel carcinoma della lingua

2.1. Generalità

Con il termine “prognosi” (dal greco: *προ-*, "prima" + *γνώσις*, "conoscere, sapere") in medicina si intende la previsione sul decorso e sull'esito di una malattia in base a date condizioni di salute¹ [82, 83].

Perciò la ricerca in campo prognostico riguarda lo studio della relazione che intercorre tra lo stato di salute iniziale in persone affette da una determinata patologia (definito startpoint) e i loro esiti futuri (definiti endpoints) [84].

In campo oncologico i fattori prognostici vengono tradizionalmente classificati in tre categorie: i fattori direttamente associati al tumore, di tipo anatomopatologico o molecolare; i fattori specifici dell'ospite, riguardanti le caratteristiche demografiche e le condizioni cliniche generali; e i fattori ambientali, comprendenti sia le condizioni socio-economiche dei pazienti che la possibilità di accesso a determinati tipi di cure [83]. Nel corso delle ultime decadi i risultati ottenuti dagli studi prognostici, soprattutto in campo oncologico, sono divenuti sempre più importanti, in quanto si è compreso come il loro apporto sia fondamentale per migliorare sia gli standard terapeutici che gli outcome clinici [85].

Attualmente il principale limite di questo tipo di indagini è di carattere metodologico: infatti, rispetto ai trial clinici o alle indagini epidemiologiche, gli studi prognostici hanno sofferto per lungo tempo la mancanza di standard di ricerca uniformemente accettati.

Per questo motivo, nel 2013 un gruppo di ricercatori ha portato avanti un progetto chiamato PROGNosis RESEARCH Strategy (PROGRESS) al fine di classificare le tipologie di studi prognostici.

¹ “Prognosis is the prediction of the probable outcome of an individual's current medical condition. A prognosis is made on the basis of the normal course of a disease, the individual's physical and psychological condition, and additional factors such as therapeutic approach”.

Il PROGRESS ha fornito una cornice teorica coerente e univoca a questo tipo di studi, suddividendoli in 4 macroaree:

1. Gli studi prognostici di base (*fundamental prognostic research*) i quali valutano sia il decorso naturale di una determinata malattia che gli outcome in base agli standard di cura accettati nella pratica clinica corrente [84];
2. Gli studi sui fattori prognostici (*prognostic factor research*) i quali studiano il possibile ruolo svolto da specifici fattori, in particolare i biomarcatori, nella prognosi di una malattia [85];
3. Gli studi sui modelli prognostici (*prognostic model research*) incentrati sullo sviluppo e la validazione di modelli statistici basati su specifiche combinazioni di fattori prognostici, al fine di predire il rischio che un determinato paziente ha di avere un determinato esito [86];
4. Le ricerche di medicina stratificata (*stratified medicine research*) con lo scopo di definire degli iter terapeutici mirati a specifici gruppi di pazienti con determinate caratteristiche [87].

Risulta evidente come l'integrazione di queste 4 macroaree rappresenti un importante percorso traslazionale capace di portare i risultati ottenuti in laboratorio nella pratica clinica, al fine di migliorare gli outcome clinici.

2.1.1. Studi prognostici di base

Il primo livello del sistema PROGRESS riguarda lo studio di una malattia nelle sue “condizioni basali”. In particolare, questi studi si concentrano sugli outcome in soggetti affetti da una determinata malattia in relazione agli iter diagnostico-terapeutici impiegati nella pratica clinica corrente. In alternativa, gli studi prognostici di base si focalizzano sulla prognosi delle patologie in caso di assenza di cure; in questo caso si parla di storia naturale della malattia [88].

Sebbene importante, la definizione di questi specifici studi evidenzia come in realtà il termine “prognosi” debba essere sempre contestualizzato in un contesto clinico e più in generale socio-sanitario. Infatti, questi studi riescono ad evidenziare la presenza di eventuali variazioni sia tra singoli

pazienti che tra interi gruppi di pazienti (ad esempio soggetti oncologici con diverso status socio-economico o trattati in Paesi diversi) [84].

L'importanza di questi studi risiede nella capacità di fornire ai professionisti della salute delle informazioni utili per poter prendere delle decisioni di Salute pubblica, in quanto è necessario poter stimare il modello di distribuzione di una malattia nella popolazione generale, al fine di allocare le risorse per interventi di prevenzione primaria e secondaria nel modo più efficiente possibile [89]. Un altro aspetto legato alla Salute pubblica riguarda la possibilità di confrontare i risultati provenienti da diverse aree geografiche o settori della popolazione, per poter generare delle ipotesi sull'esistenza di nuovi fattori prognostici su cui concentrare la ricerca clinica [90]. Studi di questo genere possono anche fornire degli indizi importanti per la definizione di entità nosologiche precedentemente sconosciute, suggerendo come prognosi differenti sottostanno a meccanismi eziopatogenetici distinti [84].

2.1.2. Studi sui fattori prognostici

Il secondo livello del sistema PROGRESS si focalizza sui fattori prognostici. In particolare, gli studi sui fattori prognostici hanno lo scopo di identificare quei fattori associati agli esiti clinici in soggetti con una determinata patologia. Un fattore prognostico è definito come una qualsiasi misura che, tra i soggetti con una data condizione di salute, è associata a un determinato outcome clinico [85].

I fattori prognostici più ricercati in assoluto sono i cosiddetti biomarcatori, definiti come una qualsiasi sostanza, struttura o processo che può essere misurato nell'organismo o nei suoi prodotti e che influenza o predice l'incidenza di determinati esiti o malattie² [91]. Sebbene esistano diverse definizioni di biomarcatore, si può affermare che tutte prevedono di includere all'interno di questa

² “any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and influence or predict the incidence of outcome or disease”.

categoria ogni possibile variabile obiettivabile in ambito biomedico (demografiche, cliniche, radiologiche, anatomopatologiche, molecolari) [92].

Lo scopo della ricerca sui fattori prognostici è quello di individuare quei fattori che permettono di distinguere gruppi di persone affette dalla stessa patologia ma con prognosi significativamente diversa. Ad esempio in campo oncologico la diagnosi è accompagnata dalla stadiazione clinico-patologica sulla base dei parametri compresi nel TNM, che sono a tutti gli effetti dei biomarcatori prognostici [93].

È necessario evidenziare che un fattore prognostico, sebbene sia intrinsecamente associato allo status di una malattia, non necessariamente è legato ad essa da un rapporto di causalità. Ciò vuol dire che, sebbene un fattore causale possa avere un valore prognostico, in quanto intervenire su di esso può cambiare significativamente il decorso di una malattia, la relazione inversa non è necessariamente vera. In particolare, non si dovrebbe mai presumere che intervenire direttamente su un fattore prognostico possa migliorare l'outcome di una malattia. Infatti molti fattori prognostici non hanno una relazione di causalità con la patologia sottostante; essi sono semplicemente dei parametri associati ai veri fattori causali, spesso sconosciuti, rappresentandone al più degli epifenomeni [85]. Nonostante questo limite intrinseco, i fattori prognostici risultano un prezioso strumento nella ricerca biomedica e nella pratica clinica.

L'identificazione di nuovi fattori prognostici può risultare utile nell'ampliare i criteri d'inclusione dei pazienti negli studi clinici. Infatti tali fattori, se non correttamente identificati, possono agire da fattori confondenti, riducendo la validità dei risultati ottenuti da uno studio [94]. Alcuni fattori prognostici possono risultare utili nell'individuare quei gruppi di pazienti che possono trovare più giovamento in una determinata terapia. Ad esempio in campo oncologico un fattore prognostico potrebbe essere associato ad un più alto rischio di recidiva, suggerendo un maggior beneficio per certi pazienti nell'impiego di una terapia chirurgica più aggressiva [72]. È inoltre possibile, sebbene non frequente, che alcuni fattori prognostici possano predire anche la risposta ad una terapia; in tal caso si parla di fattore predittivo. A titolo d'esempio, numerosi studi di immunooncologia nel carcinoma orale stanno

valutando la possibilità di impiegare il marcatore Programmed death-ligand 1 (PD-L1) come marcatore predittivo [95]. Un altro impiego dei marcatori prognostici è quello di utilizzarli per il monitoraggio della progressione di una malattia o della risposta ad un trattamento, come nel caso della chemioterapia antineoplastica.

Gli studi sui fattori prognostici si possono suddividere in studi esplorativi e studi di validazione. Negli studi esplorativi si indaga se uno o più biomarcatori abbiano o meno un ruolo prognostico e di che tipo, solitamente sulla base di un'ipotesi biologica sottostante. Una volta che un potenziale fattore prognostico è stato individuato, vengono condotti gli studi di validazione da parte di altri gruppi di ricerca, al fine di confermarne l'utilità e ipotizzarne una futura applicazione clinica [85]. Sebbene gli studi di questo tipo indaghino tipicamente uno o pochi biomarcatori, il tumultuoso sviluppo della bioinformatica avvenuto negli ultimi anni ha fornito quegli strumenti analitici tali da poter studiare migliaia di biomarcatori contemporaneamente, permettendo l'avvento delle scienze omiche [96].

Ad oggi il principale limite a questo tipo di studi è la mancanza di una metodologia di ricerca ben definita ed omogenea, portando a ridurre drasticamente l'utilità dei risultati ottenuti. A tal proposito sono state sviluppate delle linee guida per la corretta conduzione degli studi prognostici in campo oncologico, chiamate REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK) [97].

2.1.3. Studi sui modelli prognostici

Il terzo livello del sistema PROGRESS è incentrato sui modelli prognostici, detti anche modelli predittivi, definiti come una combinazione formale di molteplici parametri (predittori) che può essere impiegata su un singolo paziente per predire il suo rischio di giungere ad un determinato endpoint [86]. In teoria un modello prognostico adeguatamente sviluppato permetterebbe di stabilire fin dal momento della diagnosi se un paziente, affetto da una specifica patologia e con un determinato

startpoint, rischi di avere un determinato esito clinico in un certo periodo di tempo e di calcolare tale rischio [98].

L'uso dei modelli prognostici si inserisce in quel movimento culturale all'interno della scienza medica che mira al raggiungimento di una medicina di precisione, detta anche medicina stratificata (*stratified medicine*) che ha lo scopo di personalizzare il più possibile la prevenzione, la diagnosi e le terapie in base al singolo paziente [87].

Il razionale dello sviluppo di modelli prognostici risiede nel fatto che per predire adeguatamente determinati endpoint clinici è necessario impiegare molteplici fattori prognostici. Tali fattori possono però influenzarsi a vicenda ed avere un peso diverso nel determinare la prognosi, rendendo perciò necessario l'impiego di modelli matematici. Sebbene lo sviluppo di modelli prognostici sia abbastanza diffuso in letteratura, il loro impiego nella pratica clinica appare ad oggi ancora limitato. Questo perché per sviluppare un buon modello prognostico è essenziale, oltre ad un'accurata selezione dei singoli fattori prognostici, anche una rigorosa modellizzazione [99]. I modelli prognostici vengono fatti derivare dai risultati ottenuti dalle tecniche di regressione multivariata, solitamente mediante la regressione logistica o la regressione di Cox [100]. È importante evitare il fenomeno chiamato sovradattamento (*overfitting*), in cui un modello statistico si adatta ai dati del campione analizzato perché ha un numero eccessivo di parametri rispetto al numero di osservazioni [86].

Analogamente agli studi sui fattori prognostici, l'impiego nella pratica clinica di modello prognostico richiede che esso sia prima sottoposto a delle validazioni esterne, su coorti di pazienti più ampie e provenienti da contesti diversi da quelli in cui è nato il modello prognostico. Il ricorso a validazioni interne rende il processo più semplice, sebbene tale approccio risulti statisticamente inefficiente e metodologicamente debole [101].

Il continuo progresso delle conoscenze in ambito biomedico può rendere alcuni dei fattori inclusi nei modelli prognostici obsoleti. Per questo è importante prendere in considerazione l'aggiornamento di

un modello prognostico, al fine di rimpiazzare i predittori che soffrono di una maggiore variabilità interosservatore con biomarcatori più affidabili [102].

2.1.4. Ricerche di medicina stratificata

La ricerca in campo prognostico rappresenta un elemento essenziale per poter giungere alla cosiddetta medicina stratificata [87]. Con questo termine si intende quel particolare approccio che propone una maggiore personalizzazione della salute, con la conseguente scelta di decisioni terapeutiche che risultino mirate per determinati sottogruppi di pazienti. In questo modo, i pazienti affetti da una determinata patologia verrebbero stratificati in sottogruppi che condividono le medesime caratteristiche biologiche, permettendo la somministrazione di trattamenti mirati e la massimizzazione del risultato terapeutico [103].

Il modo migliore per ottenere una stratificazione dei pazienti è quello di applicare dei modelli prognostici, al fine di individuare quei fattori che possono essere predittivi di un miglioramento a fronte di una determinata terapia. Per questo l'impiego della ricerca in campo prognostico fornisce una serie di vantaggi a questo tipo di approccio, in primis evidenziando l'eventuale presenza di importanti variazioni prognostiche tra soggetti affetti da una stessa malattia [84]. È però necessario ricordare che molti fattori prognostici non forniscono informazioni di tipo predittivo e, viceversa, un fattore predittivo può non possedere anche un valore prognostico [87].

Esistono ancora numerose sfide di tipo metodologico che devono essere superate per poter giungere ad un quadro sistematico che guidi la ricerca nel campo della medicina di precisione. Ciononostante, la ricerca in campo prognostico può fornire importanti contributi nell'ambito della scoperta, dello sviluppo e dell'implementazione di nuovi approcci utili al raggiungimento di una medicina di precisione nella pratica clinica.

2.2. La prognosi del carcinoma della lingua

La mortalità dei pazienti affetti da carcinoma orale è rimasta inspiegabilmente stabile da oltre 20 anni, contrariamente a quanto è avvenuto per molti altri tumori maligni. Nel caso dell'OTSCC, alcuni studi recenti hanno suggerito una modesta ma costante tendenza al miglioramento della prognosi rispetto alle altre sottosedie del cavo orale a partire dagli anni 2000, a prescindere dallo stadio della malattia [34]. Tale miglioramento potrebbe essere legato ai progressi ottenuti nelle strategie terapeutiche, che hanno permesso di ottenere un miglior controllo locoregionale dell'OTSCC [104]. In particolare, il maggior impiego della dissezione elettiva del collo e della radioterapia potrebbero essere i fattori responsabili di tale miglioramento, sebbene alcuni autori suggeriscano che questo trend sia indipendente dal tipo di trattamento [34].

La sopravvivenza a 5 anni è superiore all'80% per gli OTSCC in stadio preoce (Stadio I e II) mentre è attorno al 50% per quelli in stadio avanzato (III e IV) [55]. In particolare, molti casi classificati in Stadio I sono trattati con la sola chirurgia ed hanno una prognosi eccellente. I casi in Stadio II hanno una sopravvivenza superiore al 60%, senza mostrare differenze significative tra il trattamento chirurgico e la radioterapia [105].

Per l'OTSCC, e più in generale per il carcinoma orale, la presenza di metastasi linfonodali alla diagnosi è considerato come il fattore prognostico più importante, sia per il rischio di sviluppare una recidiva che per la sopravvivenza specifica da malattia [106]. Le recidive regionali interessano soprattutto i linfonodi cervicali ipsilaterali alla sede del tumore primitivo.

Purtroppo in questo tipo di tumore è presente un rischio non trascurabile di avere delle metastasi occulte, il quale risulta essere funzione della dimensione del tumore primitivo. Si è calcolato che un paziente affetto da OTSCC e con uno status linfonodale N0 ha un rischio del 17% di avere metastasi occulte in caso di tumore classificato come T1, del 45% per un tumore T2, fino a raggiungere un rischio dell'86% in caso di tumore avanzato (T3-T4) [105]. Per questo motivo, diversi autori

suggeriscono la necessità di condurre una dissezione del collo anche in caso di assenza di metastasi linfonodali alla diagnosi, almeno per i casi T2-T4 [107].

Il rischio di sviluppare una recidiva locoregionale appare maggiore nel periodo post-operatorio iniziale; infatti, il 75% delle recidive riportate dai pazienti affetti da OTSCC sembra manifestarsi entro il primo anno dall'intervento [108].

Alla luce dell'importanza ricoperta dalla positività linfonodale nel predire il rischio di recidiva negli OTSCC, numerosi studi si sono concentrati sulla possibilità di sviluppare metodiche di misurazione alternative al parametro pN, capaci di riflettere maggiormente la reale estensione della malattia linfonodale. Infatti, il principale limite del pN è quello di sottostimare il reale numero di linfonodi coinvolti, compromettendo l'accuratezza della valutazione prognostica del sistema di staging [109].

Uno dei sistemi di valutazione più promettenti negli ultimi anni è la densità linfonodale, chiamata anche rapporto linfonodale (*lymph node ratio*, LNR). Il LNR corrisponde al rapporto tra i linfonodi positivi e il numero totale di linfonodi rimossi chirurgicamente e sottoposti a valutazione istopatologica [110, 111]. Tale rapporto ha lo scopo di compensare la presenza di potenziali bias di campionamento utilizzando una combinazione di questi due dati. In particolare, il valore di LNR è influenzato dai tre principali fattori coinvolti nella determinazione dello staging linfonodale: il fattore tumorale, rappresentato dal numero vero di linfonodi positivi; il fattore chirurgico, riguardante l'effettivo numero di linfonodi rimossi durante la dissezione del collo; e il fattore di campionamento, determinato dall'accuratezza e dalla completezza della valutazione istologica [110].

Diversi studi suggeriscono che il LNR sembra essere sufficientemente sensibile da identificare sottopopolazioni di pazienti con lo stesso valore di pN ma caratterizzati da un diverso rischio di sviluppare recidive locoregionali e a distanza [112-114]. Ciononostante, non tutti gli autori concordano sulla reale superiorità prognostica del LNR nel discriminare i pazienti affetti da OTSCC rispetto al tradizionale pN [115]. Una recente metanalisi ha confermato la validità del LNR come fattore prognostico indipendente, sebbene siano necessarie ulteriori conferme da parte di studi

prospettici su ampie coorti di pazienti prima di considerare una sostituzione del parametro pN tradizionale nel sistema TNM [116].

L'età sembra essere un fattore capace di influenzare significativamente la sopravvivenza dell'OTSCC. L'OTSCC nei pazienti giovani è tradizionalmente considerato come un tumore particolarmente aggressivo, caratterizzato sia da un elevato rischio di recidive loco-regionali che da un tasso di sopravvivenza minore rispetto a quello dei pazienti più anziani [16, 117]. Infatti sembra che nei più giovani l'OTSCC recidivi prima e più frequentemente, con una sopravvivenza libera da malattia a 5 anni che oscilla dal 30% al 72% a seconda degli studi [12, 118]. Ciononostante, la prognosi nei soggetti giovani sembra essere cambiata nel corso del tempo, migliorando progressivamente fino a diventare, a partire dagli anni 2000, addirittura superiore rispetto agli OTSCC tradizionali [44]. La migliore sopravvivenza globale potrebbe essere verosimilmente legata al fatto che i giovani, essendo maggiormente in salute, hanno un minor rischio di morte da complicazioni mediche. I soggetti affetti da OTSCC, e più in generale da carcinoma orale, che non rientrano nella categoria demografica dei giovani mostrano una prognosi peggiore al progressivo aumento dell'età d'insorgenza [119].

Per quanto riguarda l'etnia, sono disponibili pochi dati provenienti soprattutto dagli USA, i quali hanno evidenziato la presenza di una certa disparità razziale in termini di prognosi dell'OTSCC. È bene precisare che tale differenza è verosimilmente attribuibile all'effetto dei fattori socio-economici, i quali possono indirettamente influenzare la possibilità di accesso alle strutture sanitarie per un efficace e tempestivo percorso diagnostico-terapeutico [18].

Una familiarità per l'OTSCC sembra associata ad una migliore sopravvivenza specifica da malattia, probabilmente perché tali soggetti si sottopongono più frequentemente a screening più serrati. Questo approccio può condurre ad una maggiore probabilità di intercettare la comparsa di una neoplasia ad uno stadio precoce, influenzando di conseguenza la prognosi [120].

Un ulteriore aspetto da dover considerare è il rischio nel lungo termine di sviluppare una seconda neoplasia nelle vie aerodigestive superiori. Questo fenomeno potrebbe essere legato alla continua

esposizione a certe sostanze cancerogene, al fenomeno della cancerizzazione di campo o a una predisposizione genetica. In questi casi i soggetti, sebbene più giovani, sembrano avere una prognosi decisamente scarsa, facendo sorgere dei dubbi sull'effettiva utilità di programmi di screening mirati [121].

2.3. Fattori prognostici istopatologici nel carcinoma della lingua

Per la stadiazione dell'OTSCC sono richiesti solamente i parametri T, N e M. Ciononostante, esistono altri parametri di tipo istopatologico la cui valutazione potrebbe essere utile nel management clinico in quanto sembrano avere un valore prognostico.

2.3.1. Varianti istologiche del carcinoma squamocellulare

La forma istologica in assoluto più comune dell'OTSCC, e più in generale del carcinoma orale, è il carcinoma squamocellulare di tipo cheratinizzante. Tale tipologia è considerata il prototipo dell'OTSCC e tutte le altre varianti sono rapportate ad essa per quanto riguarda la prognosi.

Il carcinoma squamocellulare verrucoso è una variante istologica ben differenziata, caratterizzata da invaginazioni di epitelio squamoso ben differenziato e dalla mancanza degli usuali criteri citologici di malignità. Questo tipo di tumore ha una crescita lenta e di tipo compressivo, con invasività locale; per questo motivo la prognosi è ottima, con sopravvivenza globale a 5 anni attorno al 80-90% [122].

Il carcinoma squamocellulare basaloide è una variante istologica di tipo bifasico, in cui ad una componente basaloide predominante se ne associa una seconda con differenziazione squamosa. Il pattern di crescita è di tipo solido, con isole neoplastiche strettamente organizzate formate da piccole cellule di aspetto basaloide. La variante basaloide ha una crescita aggressiva con prognosi tendenzialmente sfavorevole; in particolare, il 75% dei pazienti sviluppa metastasi locoregionali ed il 35-50% presenta metastasi a distanza [123].

Il carcinoma squamocellulare papillare è una variante rara a livello dell'OT, caratterizzata da papille con un sottile core fibrovascolare rivestito da cellule epiteliali displastiche o cellule basaloidi. La prognosi sembra essere migliore rispetto all'OTSCC convenzionale, conseguente alla limitata capacità di invasione e al basso potenziale metastatico [124].

Il carcinoma squamocellulare a cellule fusate è una variante composta da una componente squamocellulare e una componente maligna a cellule fusate/pleomorfiche. Il pattern di crescita è tipicamente disordinato, con caratteristiche francamente maligne come: l'ipercellularità, la necrosi diffusa, le figure mitotiche atipiche e il marcato pleomorfismo nucleare. Le metastasi linfonodali si sviluppano nel 25% dei casi, mentre le metastasi a distanza sono presenti nel 5-15% dei casi [125].

Il carcinoma adenosquamoso è una neoplasia altamente infiltrativa con differenziazione squamosa e ghiandolare. La presenza di necrosi, di mitosi e di invasione vascolare e perineurale riflettono la natura altamente aggressiva di questa variante. La prognosi è scarsa, mostrando una sopravvivenza a 5 anni inferiore al 50%. Il potenziale metastatico è elevato, interessando i linfonodi locoregionali nel 75% dei casi e il tessuto polmonare nel 25% dei pazienti [126].

Il carcinoma linfoepiteliale è una rara variante scarsamente differenziata, caratterizzato da un importante infiltrato linfoplasmocitico reattivo. Colpisce quasi esclusivamente la base della lingua ed è composto da isole sinciziali e clusters di cellule tumorali con nuclei vescicolari, bordi cellulari scarsamente definiti e ridotto citoplasma. Questa variante istologica risulta radiosensibile, permettendo di ottenere il controllo regionale in un'elevata percentuale, nonostante ci sia coinvolgimento linfonodale nel 70% dei casi [127].

Il carcinoma cuniculatum è una variante estremamente rara dell'OTSCC, caratterizzata da aggressività locale e scarso potenziale metastatico. Istologicamente è composto da proliferazione di epitelio squamoso in ampi processi dal core cheratinizzato e cripte ricche di cheratina, che tendono ad introflettersi nei tessuti sottostanti, in assenza di evidenti caratteristiche di malignità [128].

2.3.2. Grado istologico

Il grado istologico o grading rappresenta una misura del grado di differenziazione tumorale valutato sulla base delle caratteristiche citoarchitetture. Questa modalità di valutazione della malignità tumorale fu introdotta nel 1920 da Broders e nel corso degli anni è stata modificata più volte, fino all'attuale sistema descritto nei manuali del WHO (Tabella 6) [129].

Il valore prognostico del grading nell'OTSCC è altamente dibattuto, data la mancanza di criteri valutativi oggettivi che portano inevitabilmente ad un'elevata variabilità interosservatore [130]. Sebbene la valutazione del grading sia ben consolidata nella pratica clinica, lo scarso valore prognostico di questo parametro non ne consentono né la correlazione con il rischio di sviluppare metastasi linfonodali né l'impiego per la pianificazione del trattamento [94, 129].

Tabella 6. Classificazione del grado istologico

G	Definizioni
GX	Non è possibile stabilire il valore di G
G1	Carcinoma ben differenziato
G2	Carcinoma moderatamente differenziato
G3	Carcinoma scarsamente differenziato

2.3.3. Profondità d'invasione

Il DOI rappresenta l'infiltrazione neoplastica ed è un parametro differente dallo spessore tumorale: mentre quest'ultimo considera il diametro massimo del tumore, il DOI invece valuta l'invasività del carcinoma indipendentemente dalla sua componente esofitica. La misurazione del DOI dovrebbe essere effettuata a partire dal livello della membrana basale della mucosa sana adiacente alla massa

tumorale. Una volta individuata una linea orizzontale parallela a tale livello, viene stabilita una linea perpendicolare fino al punto di maggior profondità raggiunto dal carcinoma [94]. Da questo si deduce come la misurazione del DOI e dello spessore tumorale, eseguita dal patologo con una guida millimetrata, possano dare dei valori “discordanti” [131]. In caso di dubbio deve essere attribuito il valore minimo di DOI per evitare cambiamenti di stadio. Tale parametro, integrato nella nuova classificazione pTNM, è fattore prognostico indipendente correlato a stadio di malattia avanzata e sviluppo di metastasi linfonodali [132, 133]. Le attuali linee guida dell’AJCC identificano tre categorie di rischio: neoplasie poco invasive ($DOI \leq 5$ mm), moderatamente invasive ($5\text{mm} < DOI \leq 10$ mm) e altamente invasive ($DOI > 10$ mm) [94].

2.3.4. Estensione extranodale

L’ENE è un parametro morfologico prognostico recentemente integrato nella stadiazione del carcinoma orale presente nell’ultima edizione dell’AJCC [94]. L’ENE identifica l’estensione della metastasi oltre i confini anatomici del linfonodo, attraverso la capsula e nel connettivo circostante indipendentemente dalla reazione stromale associata [59]. All’esame istopatologico l’estensione della malattia può essere definita microscopica (ENEmi) se è minore di 2 mm, e macroscopica (ENEMA) se l’estensione del tumore oltre la capsula supera i 2 mm. È necessario sottolineare che allo stato attuale solo il parametro ENEMA è considerato stadiale per l’OTSCC [94].

2.3.5. Pattern d’invasione tumorale

Uno degli aspetti tradizionalmente più studiati nei carcinomi è il fronte d’invasione tumorale, sulla base dell’ipotesi che le sue caratteristiche morfologiche potrebbero suggerire un comportamento più o meno aggressivo. Ciononostante, solo negli ultimi anni si è cercato di standardizzare questo aspetto,

allo scopo di parametrizzare il pattern d'invasione tumorale (*pattern of invasion*, POI) e conseguentemente ridurre la variabilità intra- e interosservatore [134].

Il tentativo più promettente si è dimostrato essere la valutazione del pattern d'invasione peggiore (*worst pattern of invasion*, WPOI) sulla base della classificazione di Brandwein-Gensler [135].

Numerosi studi hanno dimostrato che il WPOI è un fattore prognostico indipendente di recidiva locoregionale e di sopravvivenza specifica da malattia [134-136].

Sebbene non sia stato integrato nel sistema di stadiazione dell'AJCC, le attuali linee guida ne suggeriscono la valutazione come fattore prognostico aggiuntivo. Al fine di semplificare l'analisi anatomopatologica, l'AJCC consiglia di valutare solamente la presenza o meno del WPOI di tipo 5 (WPOI-5), definito come la presenza di un pattern non coesivo caratterizzato da isole di tessuto tumorale distanti almeno 1 mm tra di loro a livello del fronte infiltrativo [94].

Sono stati proposti differenti sistemi di classificazione del pattern d'invasione tumorale sulla base delle caratteristiche morfologiche, come il pattern d'invasione prevalente (PPOI). Ciononostante, il principale limite di tali sistemi risiede nell'ancora non trascurabile variabilità interosservatore, principalmente conseguente all'eterogeneità del fronte infiltrativo e alla mancanza di criteri quantitativi che definiscano univocamente il modello d'invasione [132, 133].

2.3.6. Margini di resezione

In termini prognostici, risulta fondamentale distinguere il margine intraoperatorio, influenzato dal piano di trattamento e dal metodo di campionamento adottato, ed il margine chirurgico che guida le scelte terapeutiche postoperatorie. Il margine di resezione di un tumore può essere classificato come: "libero" o "negativo" se la distanza dal tessuto tumorale è maggiore di 5 mm, "prossimo" se il carcinoma dista 1-5 mm dal margine e "positivo" in presenza di tessuto tumorale a meno di 1 mm dal margine di resezione o anche in presenza di displasia moderata o severa nel margine [137].

La presenza di margini positivi è obbligatoria la pianificazione di un ulteriore intervento chirurgico o di una terapia adiuvante postoperatoria. Tuttavia, diversi studi hanno evidenziato come i tumori con margini negativi non siano esenti da recidive. Inoltre, il reale valore prognostico del margine “prossimo” è incerto, in quanto il cut-off scelto per tale categoria è del tutto arbitrario. A tutto ciò si aggiungono ulteriori fattori confondenti, in primis la contrazione del pezzo chirurgico a seguito della fissazione in formalina [138].

2.3.7. *Invasione perineurale*

L'invasione perineurale (*perineural invasion*, PNI) è un parametro istologico caratterizzato dall'infiltrazione da parte delle cellule tumorali di uno dei tre strati della guaina nervosa (epinevrio, perinevrio ed endonevrio) e/o come la presenza di tessuto tumorale in stretta prossimità di un nervo. La PNI è considerato un fattore prognostico aggiuntivo dall'AJCC, la quale raccomanda la sottoclassificazione di questo parametro in base alla posizione rispetto alla massa tumorale (PNI intratumorale o extratumorale) e al numero di fibre nervose coinvolte (PNI focale o plurifocale) [94]. Molti autori hanno evidenziato come la presenza della PNI nell'OTSCC sia significativamente associata ad un aumento del rischio di recidive locali e locoregionali, soprattutto nei tumori in stadio iniziale [139].

Tuttavia, non esiste ancora un accordo su alcuni aspetti legati alla PNI, come il grado di vicinanza necessario tra cellule tumorali e fibre nervose o l'estensione del coinvolgimento tumorale. La definizione attualmente più usata è quella di Liebig, che fissa il coinvolgimento tumorale di almeno 1/3 del diametro di un nervo come cut-off per considerare la presenza della PNI [140]. Purtroppo tale cut-off è riconosciuto da molti patologi come assolutamente arbitrario e difficilmente riproducibile [141].

2.3.8. *Invasione linfovascolare*

L'invasione linfovascolare (*lymphovascular invasion*, LVI) è un parametro istologico caratterizzato dalla presenza di cellule o aggregati di cellule tumorali all'interno di un vaso linfatico o sanguigno. Analogamente alla PNI, la LVI è considerato come un fattore prognostico aggiuntivo e dovrebbe essere sottoclassificato in base alla localizzazione e al numero di vasi coinvolti [94]. Diversi studi hanno trovato un'associazione tra la LVI e una ridotta sopravvivenza globale e libera da malattia, oltre che ad un aumentato rischio di sviluppare recidive locoregionali [133].

2.3.9. *Budding tumorale*

Il budding tumorale (BT) è una caratteristica istopatologica che si manifesta lungo il fronte d'invasione tumorale ed è considerato un potenziale indice di aggressività [142]. Il BT è definito come la presenza di singole cellule tumorali isolate o piccoli cluster composti da meno di 5 cellule distaccati dalla massa principale del carcinoma a livello del fronte invasivo. Questi microscopici aggregati cellulari (*tumor buds*) rappresenterebbero una sottopopolazione di cellule cancerose indifferenziate dal comportamento aggressivo [143]. Negli OTSCC il BT è stato associato ad una riduzione della sopravvivenza globale e della sopravvivenza specifica da malattia [142].

Alla luce delle potenzialità prognostiche di questo parametro in ambito oncologico, alcuni anni fa è nato l'International Tumor Budding Consensus Conference, un gruppo di lavoro che ha lo scopo di standardizzare le metodiche di valutazione del BT [144].

2.3.10. *Eosinofilia tissutale associata al tumore*

L'eosinofilia tissutale associata al tumore (*tumor associated tissue eosinophilia*, TATE) è un parametro di tipo morfologico che ha recentemente attirato l'attenzione della comunità scientifica.

Esso consiste nella quantificazione dell'infiltrato eosinofilo all'interno del microambiente tumorale, sia esso peritumorale che intratumorale [145]. Sebbene l'esatto ruolo della TATE nel carcinoma orale sia ancora sconosciuto, diversi autori ritengono che la presenza massiccia di eosinofili nel tessuto tumorale sia responsabile dell'apoptosi delle cellule cancerose mediante il rilascio di proteine citotossiche [146]. Nonostante diversi autori abbiano proposto la TATE come un fattore prognostico aggiuntivo nel carcinoma orale, l'elevata discordanza dei risultati ottenuti finora ne impedisce la sua applicazione nella pratica clinica [145].

2.3.11. Microambiente tumorale

Negli ultimi anni la ricerca scientifica si è focalizzata sul microambiente tumorale, definito come l'insieme di cellule, vasi sanguigni e componenti della matrice extracellulare attorno al quale si sviluppa una neoplasia [147]. In particolare è ormai acclarato come i cambiamenti del compartimento stromale che circonda un tumore assumano un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione neoplastica. Alla luce del rapporto biunivoco esistente tra le cellule tumorali e quelle stromali, è stato sviluppato un parametro prognostico che mira a quantificare tale aspetto, chiamato rapporto tumore-stroma (*tumor stroma ratio*, TSR) [148]. Il TSR è stato validato in diverse tipologie tumorali, mostrando come un'elevata proporzione di tessuto stromale tenda ad associarsi ad una prognosi sfavorevole, mentre neoplasie con una ridotta componente stromale abbiano una prognosi migliore. Data la sua elevata riproducibilità, il TSR potrebbe aggiungere informazioni prognostiche significative all'attuale sistema di stadiazione pTNM dell'OTSCC [149].

Il recente mutamento del paradigma oncologico ha evidenziato il ruolo che il sistema immunitario può avere nell'influenzare la crescita tumorale. Infatti anche il microambiente immunitario associato al tumore, in particolare i linfociti infiltranti il tumore (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL), sembra svolgere un ruolo rilevante nella progressione neoplastica [150]. Diversi studi condotti negli ultimi anni suggeriscono che l'organizzazione spaziale dei TIL all'interno del microambiente tumorale

giochi un ruolo cruciale nella progressione neoplastica. A tal proposito, Chen e Mellman hanno proposto una classificazione della distribuzione dei linfociti all'interno dei tumori solidi, ricavandone un parametro morfologico: l'immunofenotipo tumorale [151]. È chiaro che la valutazione della distribuzione dei linfociti nel tessuto tumorale possa facilitare l'identificazione di quei pazienti che gioverebbero maggiormente all'immunoterapia. Tuttavia, la continua evoluzione del microambiente tumorale limita la piena comprensione della risposta immunologica tumorale [152].

3. Scopo del lavoro

L'OTSCC è la principale neoplasia maligna del cavo orale, caratterizzata da un progressivo aumento dell'incidenza nelle ultime decadi e da una mortalità ancora troppo alta. Infatti, nonostante i recenti progressi ottenuti nelle strategie terapeutiche, l'OTSCC è ancora caratterizzato da un elevato tasso di recidive, il quale riduce significativamente le aspettative di vita dei pazienti.

L'ottava edizione dell'AJCC ha migliorato la capacità di stratificare i pazienti affetti da carcinoma orale. Ciononostante, le più recenti evidenze scientifiche suggeriscono come la capacità predittiva di tale sistema sia ancora da migliorare per poter discriminare quei pazienti affetti da una malattia più aggressiva, rendendo necessaria la ricerca di nuovi marcatori prognostici.

Nel corso degli anni sono stati proposti numerosi biomarcatori di tipo proteico, genetico o epigenetico per poter identificare i casi più aggressivi di carcinoma orale, allo scopo di somministrare dei trattamenti mirati e di massimizzare il risultato terapeutico. Nonostante gli sforzi, nessuno dei numerosi biomarcatori studiati mediante le tecniche di immunohistochimica, di biologia molecolare e le più recenti tecnologie "omiche" è stato validato nella pratica clinica per la stratificazione dei pazienti affetti da OTSCC, e più in generale da carcinoma orale, sulla base del rischio di recidiva e di morte da malattia. In particolare, gli alti costi e l'elevata variabilità dei risultati ne limitano l'impiego clinico nel prossimo futuro.

Per questi motivi, negli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca si sono concentrati sullo studio dei fattori morfologici del tessuto tumorale. La ragione di tale approccio risiede nel fatto che una valutazione quantitativa e standardizzata delle numerose variabili istopatologiche del tessuto neoplastico potrebbe rappresentare una promettente fonte di informazioni prognostiche.

Alla luce di tali considerazioni, lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare le principali caratteristiche morfologiche del tessuto tumorale in una coorte di OTSCC, in particolare: il pattern d'invasione tumorale, la PNI, la LVI, il BT, la TATE, il TSR e l'immunofenotipo. Successivamente, sulla base delle performance prognostiche di tali parametri a seguito dell'analisi multivariata, sono

stati sviluppati un modello prognostico e un nomogramma allo scopo di fornire uno strumento utile alla miglior stratificazione dei pazienti affetti da OTSCC.

4. Materiali e metodi

4.1. Selezione dei pazienti

La coorte d'avvio (*inception cohort*) considerata in questo studio di coorte retrospettivo era composta da pazienti della regione Marche affetti da OTSCC. I pazienti sono stati selezionati con modalità casuale dal database dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche (sistema ATHENA) nel periodo che va dal gennaio 1998 al dicembre 2014. Tutti i pazienti sono stati trattati con intento curativo presso il Dipartimento di Chirurgia Maxillofacciale dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti" di Ancona. I dati clinici e patologici dei pazienti selezionati sono stati raccolti dagli archivi di entrambi i reparti.

I criteri d'inclusione per questo studio erano: (1) diagnosi definitiva di OTSCC primitivo (definito in base ai codici di diagnosi dell'International Classification of Disease-10: C02.0, C02.1, C02.2 e C02.3); (2) età dei pazienti maggiore di 18 anni; (3) un follow-up di almeno 3 anni per i pazienti vivi; (4) residenza nella regione Marche.

I criteri d'esclusione erano: (1) carcinomi orali che coinvolgevano l'OT ed altri siti del cavo orale e per i quali non era possibile stabilire l'esatta sede anatomica d'origine del tumore; (2) recidive di OTSCC; (3) OTSCC secondi primitivi; (4) pazienti sottoposti a radioterapia o chemioterapia preoperatorie; (5) negatività all'infezione da virus del papilloma umano (*Human Papilloma Virus*, HPV) stabilita mediante le tecniche impiegate nella corrente pratica clinica (ibridazione fluorescente in situ specifica per HPV e colorazione immunohistochimica specifica per p16^{Ink4a}); (6) pazienti trattati a scopo palliativo; (7) pazienti affetti da OTSCC con morte durante l'immediato decorso post-operatorio.

I dati clinico-patologici (l'età, il sesso, lo stadio patologico, il grado istologico e lo status dei margini di resezione) sono stati raccolti e catalogati da un singolo operatore per assicurarne l'uniformità. La

stadiazione degli OTSCC è stata rivalutata da due operatori in base alla settima e all'ottava edizione dell'AJCC [6, 94].

Riguardo ai dati del follow-up, tutti i pazienti trattati per OTSCC presso il Dipartimento di Chirurgia Maxillofacciale vengono inseriti in un programma di follow-up strutturato nel seguente modo: un controllo ogni 2 mesi per il primo anno, ogni 3 mesi durante il secondo e il terzo anno e ogni 6 mesi negli anni successivi. Inoltre, se i pazienti lamentano la comparsa di segni o sintomi di sospetta recidiva, viene organizzata una visita. Pertanto, in caso di dati mancanti riguardanti il follow-up, si è optato per l'aggiornamento del database mediante contatto telefonico da parte di un operatore. È stato stabilito un follow-up massimo di 10 anni.

È stata posta attenzione sulla gestione di potenziali errori sistematici, in particolare il Referral Filter Bias: si tratta di una forma specifica di bias di selezione in cui i soggetti arruolati in uno studio per una determinata malattia non rappresentano adeguatamente la distribuzione delle caratteristiche della malattia. In particolare, una coorte di pazienti arruolati in centri di primo livello potrebbe essere differente da una identificata in centri di terzo livello. Nella regione Marche, a causa delle caratteristiche socio-demografiche e dell'organizzazione sanitaria, è presente un solo centro terziario di riferimento per la chirurgia oncologia del distretto testa-collo. Inoltre, tutte le indagini anatomopatologiche riguardanti le patologie oncologiche del cavo orale vengono condotte presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche. Per tale motivo è possibile affermare con un buon grado di accuratezza che la coorte d'avvio del presente studio è stata selezionata dal bacino d'utenza dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti" di Ancona per il carcinoma orale, corrispondente alla popolazione della regione Marche (1'525'000 abitanti).

4.2. Valutazione istopatologica

Sono state eseguite sezioni seriali da 4 µm colorate con ematossilina-eosina (H&E) ottenute dai blocchi fissati con formalina e inclusi in paraffina provenienti dalla parte più invasiva dei campioni

di OTSCC (la stessa che viene impiegata per la valutazione del parametro T). Per la valutazione dei diversi parametri istopatologici considerati in questo studio (il pattern d'invasione tumorale, la PNI, la LVI, il BT, la TATE, il TSR e l'immunofenotipo), i campioni sono stati analizzati con un microscopio ottico Olympus BM50 (Olympus, Tokyo, Giappone), inizialmente a basso ingrandimento ($\times 40$) e poi ad alto ingrandimento ($\times 200$ e $\times 400$). Le indagini sono state condotte indipendentemente da due osservatori, in cieco sui dati clinici e patologici. Per ciascun parametro, i diversi valori ottenuti indipendentemente dai due osservatori sono stati utilizzati per stabilire il grado di accordo interosservatore mediante la kappa di Cohen. Infine, nei casi di discordanza tra i due osservatori è stata organizzata una sessione congiunta al fine di dare un giudizio univoco; in caso di mancato accordo era previsto il coinvolgimento di un terzo osservatore. Questi valori "concordati" sono stati poi usati nelle successive analisi statistiche.

4.2.1. Invasione perineurale (PNI)

La PNI è stata valutata analogamente a quanto riportato da Liebig et al. [140]. Brevemente, è stata considerata la presenza di un focus di PNI nei casi in cui erano identificate cellule tumorali singole o in cluster in uno qualsiasi dei tre strati della guaina nervosa (endonevrio, perinevrio ed epinevrio) e/o nei casi in cui le cellule tumorali erano in stretto contatto con un nervo, coinvolgendo almeno 1/3 della sua circonferenza (Figura 2). Per ogni sezione analizzata è stato contato il numero totale di PNI per un'ulteriore stratificazione dei pazienti. In particolare, in caso di un unico focus di PNI, i pazienti sono stati classificati come "PNI unifocale", mentre sono stati classificati come "PNI multifocale" nel caso di ≥ 2 foci. Nella definizione di "PNI multifocale" sono stati inclusi anche quei casi sospetti in cui c'era l'apparente coinvolgimento di più diramazioni nervose strettamente ravvicinate tra loro ma che non potevano essere spiegate come parti di uno stesso nervo.

Per indagare ulteriormente il ruolo della PNI in questi pazienti, è stata considerata anche la localizzazione dei foci nervosi coinvolti, definita come "intratumorale", se erano all'interno della

massa neoplastica, o “peritumorale”, se si trovavano al di fuori della massa neoplastica ed entro un centimetro dal fronte d’invasione.

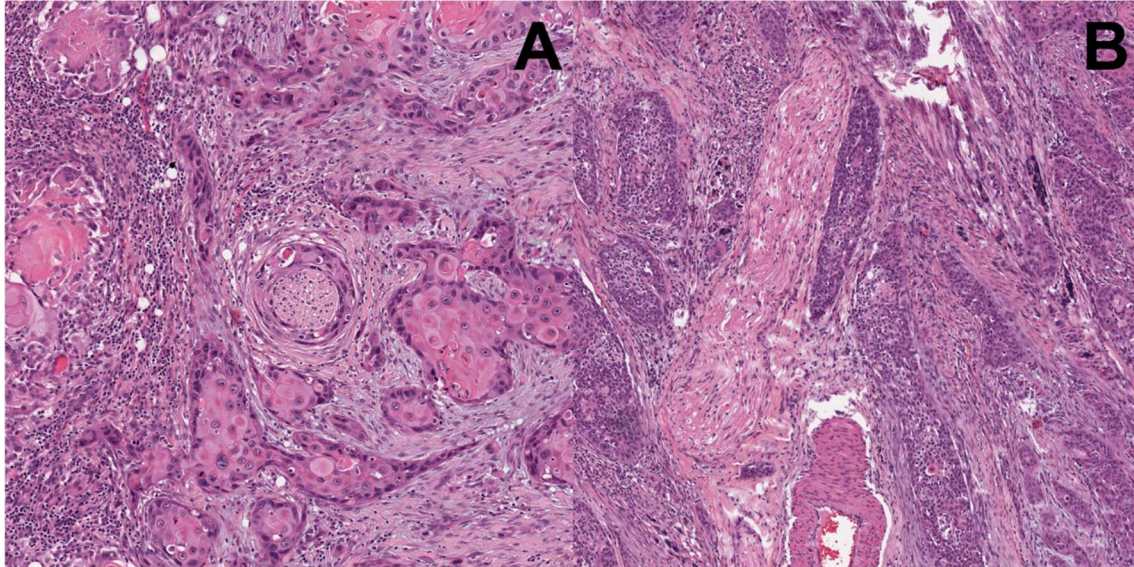


Figura 2. Esempio di PNI, in cui le cellule tumorali avvolgono completamente una fibra nervosa (A). La PNI è considerata negativa nei casi in cui le cellule tumorali, seppur in stretto contatto con un nervo, ne coinvolgono solo una piccola parte (B).

4.2.2. *Invasione linfovascolare (LVI)*

La LVI è stata valutata come la presenza di singole cellule o di piccoli cluster di cellule tumorali circondate da uno spazio vuoto e da uno strato di cellule endoteliali chiaramente visualizzabile, sia esso di natura linfatica che sanguigna [133]. Nelle situazioni dubbie o in presenza di meri artefatti, in particolare la retrazione del tessuto tumorale o la dislocazione di nidi di cellule tumorali in spazi vuoti, i casi erano considerati negativi (Figura 3) [137]. Per ogni sezione analizzata è stato contato il numero totale di LVI, per poi dicotomizzarlo in “LVI positivo” e “LVI negativo”.

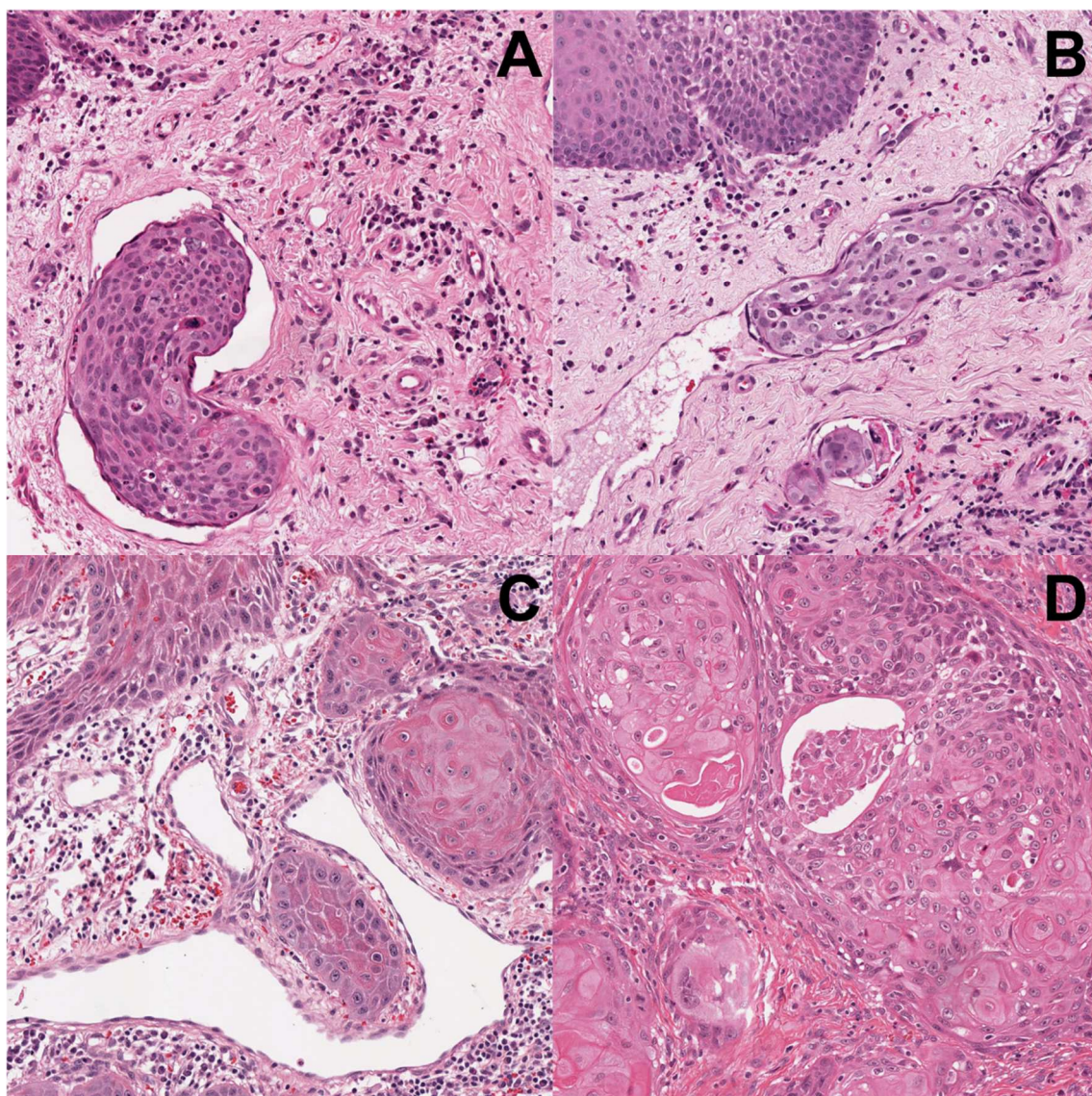


Figura 3. Esempi di LVI, in cui piccoli cluster di cellule tumorali sono localizzati all'interno di uno spazio delimitato da cellule endoteliali chiaramente visualizzabili (A, B). La LVI è considerata negativa in quei casi dubbi in cui le cellule tumorali si trovano in vicinanza di un vaso senza raggiungerlo (C), o nel caso di artefatti, come la retrazione del tessuto tumorale (D).

4.2.3. *Budding tumorale (BT)*

Il BT è stato valutato come la presenza di singole cellule tumorali isolate o di cluster di < 5 cellule distaccati dalla massa principale del carcinoma a livello del fronte invasivo [153]. Brevemente, per ogni sezione due operatori hanno selezionato congiuntamente a basso ingrandimento l'area con il

numero più alto di buds tumorali. Successivamente ogni operatore ha individuato autonomamente un'area ad alto ingrandimento ($\times 200$) per determinare il numero di buds tumorali e il conseguente valore di BT (Figura 4).

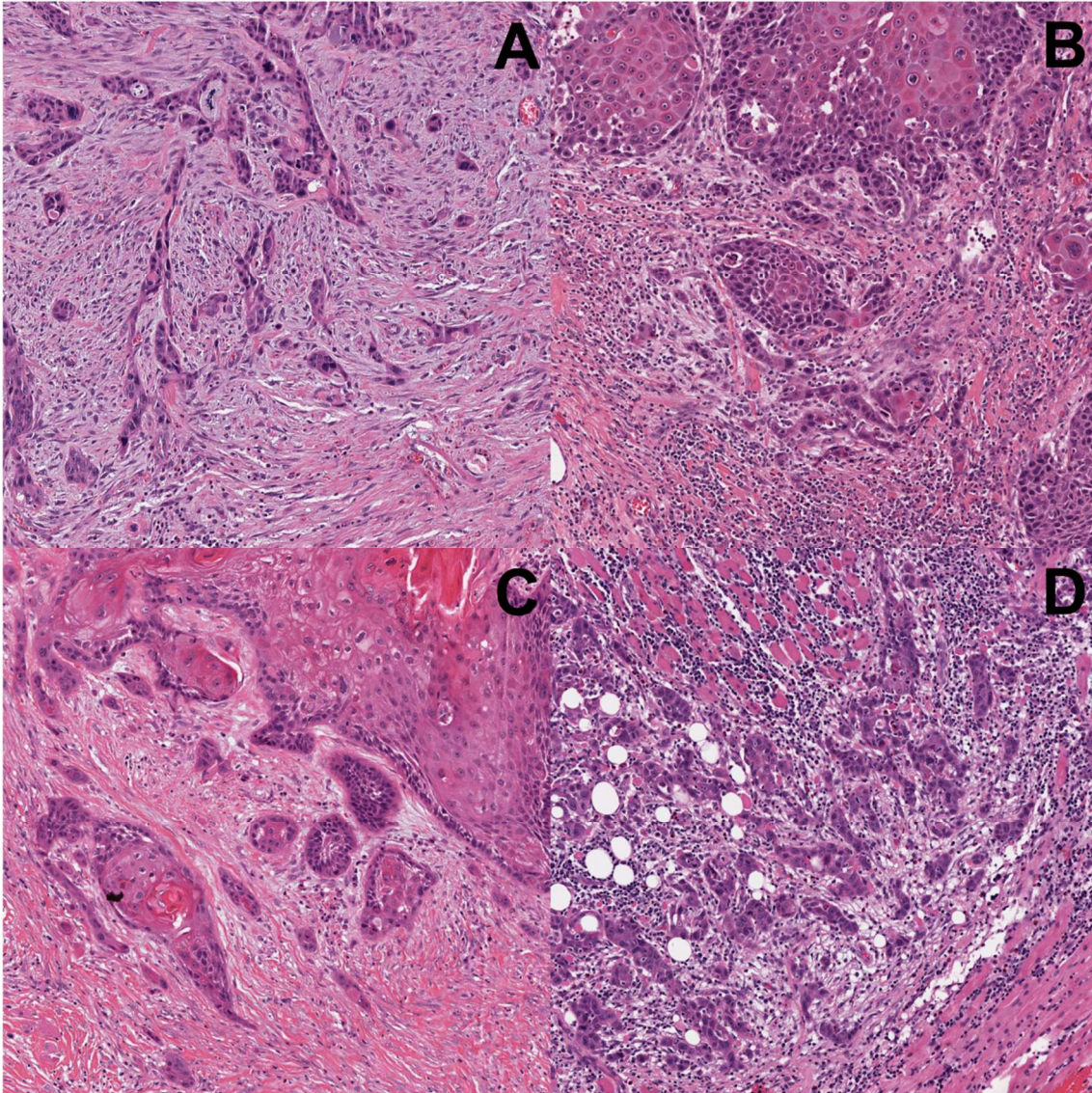


Figura 4. Immagini esemplificative di BT a livello del fronte invasivo. Ai fini della valutazione, vengono presi in considerazione solo le cellule tumorali isolate o i cluster formati da massimo 4 cellule tumorali.

4.2.4. *Pattern d'invasione tumorale (POI)*

Per ogni sezione il POI è stato valutato analizzando tutto il fronte. Brevemente, è stata valutata l'eventuale presenza dei diversi pattern d'invasione: margine d'invasione compressivo e ben delimitato (POI-1); ampi cordoni solidi o invaginazioni di cellule tumorali (POI-2); presenza di piccoli gruppi o invaginazioni (> 15 cellule) di cellule tumorali (POI-3); presenza diffusa di singole cellule o piccoli gruppi di cellule tumorali (< 15 cellule) (POI-4); presenza di satelliti tumorali di qualsiasi dimensione distanti almeno 1 mm dalla massa tumorale principale o da qualsiasi altro satellite tumorale (POI-5) (Figura 5) [134]. Successivamente, per ogni paziente è stato considerato sia il WPOI, definitivo come il valore più alto ottenuto nella valutazione dei pattern d'invasione, che il PPOI, definito come il pattern più rappresentativo individuato in ogni paziente.

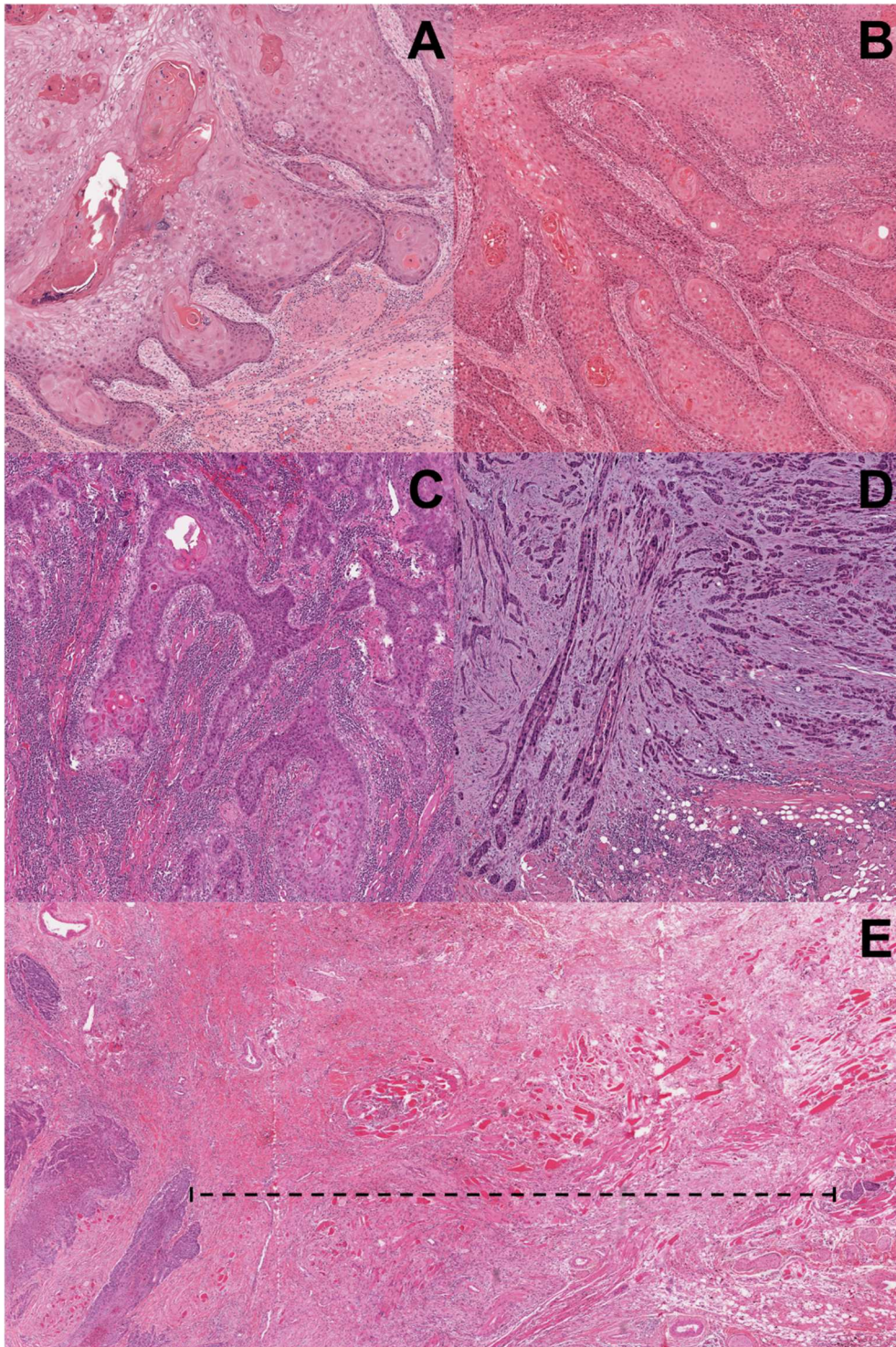


Figura 5. Immagini esemplificative dei diversi POI: POI-1, caratterizzato da un margine d'invasione compressivo e ben delimitato (A); POI-2, caratterizzato da ampi cordoni solidi e invaginazioni (B); POI-3, caratterizzato da gruppi e invaginazioni di cellule tumorali (C); POI-4, caratterizzato dalla presenza diffusa di piccoli nidi di cellule tumorali (D); POI-5, nel caso in cui siano presenti satelliti tumorali di qualsiasi dimensione distanti almeno 1 mm dalla massa tumorale (E).

4.2.5. Tumor Stroma Ratio (TSR)

Il TSR è stato valutato in base al protocollo impiegato da Mascitti et al. [154]. Brevemente, per ogni sezione due operatori hanno selezionato congiuntamente a basso ingrandimento l'area con la più alta percentuale di stroma desmoplastico. Successivamente ogni operatore ha individuato autonomamente un'area ad alto ingrandimento ($\times 200$) equivalente a $0,949 \text{ mm}^2$ per ogni campo osservato al fine di calcolare il TSR. Tale area doveva presentare nidi di cellule tumorali lungo tutti i bordi del campo osservato; inoltre sono state escluse dalle valutazioni aree specifiche come il tessuto muscolare, il tessuto ghiandolare, le aree di tessuto necrotico e i vasi sanguigni di grandi dimensioni (Figura 6 A-B).

Per ogni campo analizzato è stato dato un valore percentuale arrotondato alla decina più vicina (da 0% al 100%). Per ogni paziente è stato considerato il valore ottenuto dalla media delle due percentuali fornite dagli operatori. Successivamente i pazienti sono stati dicotomizzati in due gruppi: "TSR basso" per i casi caratterizzati da un'elevata quantità di stroma e una bassa quantità di cellule tumorali ($\text{TSR} < 50\%$); e "TSR alto" per i casi con una ridotta quantità di stroma e un'elevata quantità di cellule tumorali ($\text{TSR} \geq 50\%$) (Figura 6 C-D).

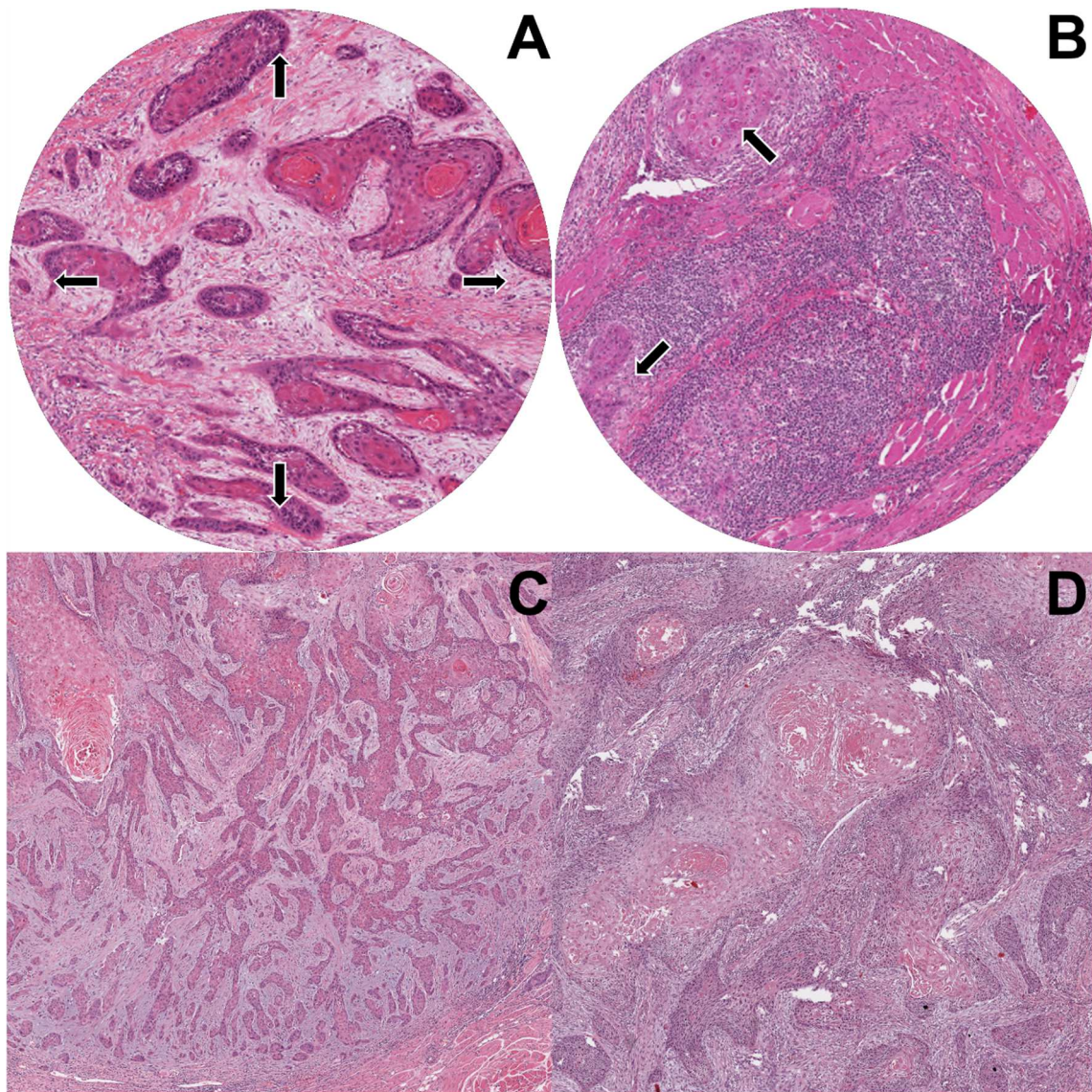


Figura 6. Esempio di valutazione del TSR: il campo visivo correttamente individuato deve presentare nidi di cellule tumorali lungo tutti i bordi (A). Al contrario, la presenza di cellule tumorali lungo solo una parte del bordo rende il campo inadatto alla valutazione del TSR (B). Esempi di OTSCC con un TSR basso (< 50%) (C) e un TSR alto ($\geq 50\%$) (D).

4.2.6. Immunofenotipo tumorale

La valutazione dell'immunofenotipo tumorale si è basata sullo studio della densità e della localizzazione dell'infiltrato linfocitario a livello del tessuto tumorale, in base alle raccomandazioni dell'International TIL Working Group e al protocollo impiegato da Troiano et al. [155, 156].

Brevemente, per ogni sezione sono state selezionate 5 aree random ad alto ingrandimento ($\times 200$) equivalente a $0,949 \text{ mm}^2$ per ogni campo osservato, al fine di stimare la percentuale di area occupata dai linfociti, sia a livello dello stroma tumorale che all'interno della massa tumorale in prossimità delle cellule neoplastiche. Per ogni campo analizzato è stato dato un valore percentuale arrotondato alla decina più vicina (da 0% al 100%). Per ogni paziente è stato considerato il valore medio ottenuto di area occupata dai TIL. I linfociti localizzati all'interno delle aree necrotiche sono stati esclusi dall'analisi.

Successivamente i pazienti sono stati classificati in 3 diversi gruppi: (1) "immunofenotipo infiammato" nei casi in cui la percentuale media di TIL individuati nella massa tumorale era $\geq 10\%$ a prescindere dalla presenza di linfociti nello stroma tumorale; (2) "immunofenotipo escluso" nei casi in cui la percentuale media di TIL individuati nello stroma tumorale era $\geq 10\%$ ma c'era una quantità trascurabile di TIL nella massa tumorale ($< 10\%$); (3) "immunofenotipo deserto" se la percentuale media di TIL individuati sia nella massa tumorale che nello stroma tumorale era $< 10\%$ (Figura 7).

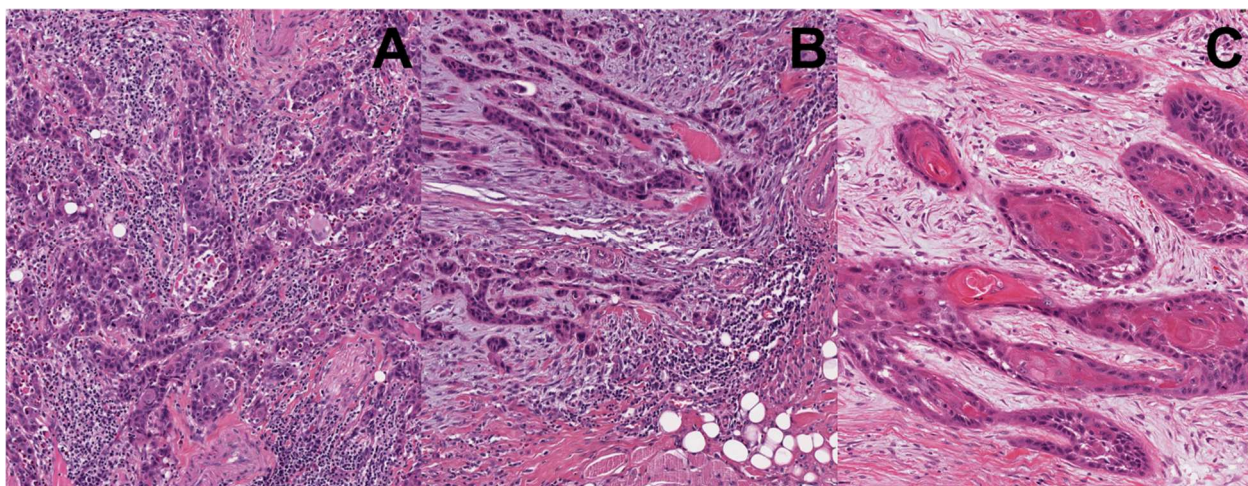


Figura 7. Immagini esemplificative dei diversi immunoprofilo: immunofenotipo infiammato, in cui è presente un denso infiltrato linfocitario sia nella massa che nello stroma tumorali (A); immunofenotipo escluso, in cui l'infiltrato linfocitario è confinato nello stroma tumorale attorno alle isole di tessuto neoplastico (B); immunofenotipo deserto, in cui il numero di linfociti a livello stromale e tumorale è trascurabile (C).

4.2.7. Eosinofilia tissutale associata al tumore (TATE)

Nella valutazione istopatologica della TATE sono state prese in considerazione solo le cellule in cui era evidente la presenza di granuli eosinofili citoplasmatici. Gli eosinofili localizzati all'interno di aree necrotiche o dei vasi sanguigni sono stati esclusi dall'analisi. Per ogni sezione analizzata sono stati contati gli eosinofili a livello del fronte invasivo mediante un obiettivo ad alta potenza ($\times 400$) equivalente a $0,237 \text{ mm}^2$ per ogni campo osservato. Successivamente è stata calcolata la densità di TATE per mm^2 , mediante il metodo suggerito da Dorta et al. [146]. Brevemente, per ogni caso è stata considerata una singola area ad alto ingrandimento di tessuto tumorale contenente il maggior numero di eosinofili. Successivamente i pazienti sono stati dicotomizzati in due gruppi: "scarsa TATE" in caso di $0-100 \text{ eosinofili/mm}^2$ e "elevata TATE" in caso di $> 100 \text{ eosinofili/mm}^2$ (Figura 8) [157].

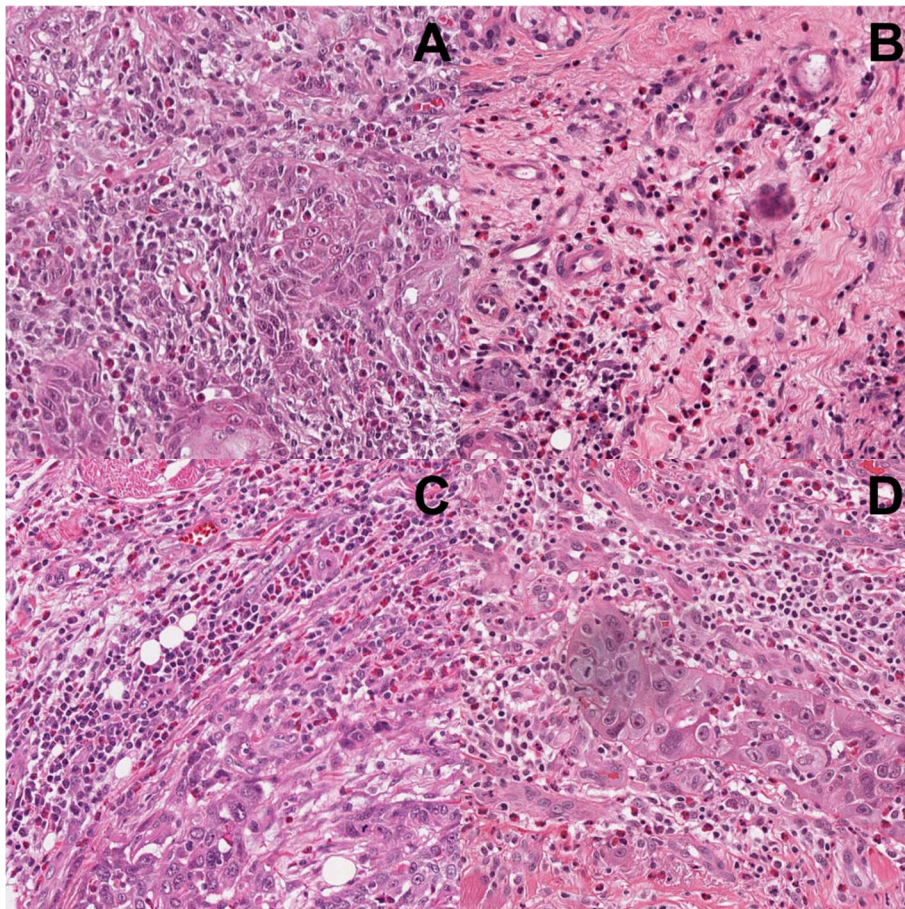


Figura 8. Esempi di TATE nel tessuto tumorale: gli eosinofili possono essere facilmente identificati dalla presenza di fini granuli eosinofili a livello citoplasmatico (A-D).

4.3. Definizione degli outcome

Gli endpoint esaminati sono stati: la sopravvivenza specifica da malattia (*disease-specific survival*, DSS), la sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) e la sopravvivenza libera da malattia (*disease-free survival*, DFS). La durata del follow-up è stata calcolata a partire dalla data dell'intervento chirurgico fino al momento della diagnosi di recidiva (DFS), oppure fino al momento del decesso del paziente per cause legate al tumore (DSS) o per altre cause (OS), oppure fino all'ultima visita eseguita.

Il consenso informato è stato ottenuto per tutti i pazienti e lo studio è stato condotto in accordo alla dichiarazione di Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects" [158] e a seguito dell'approvazione da parte del comitato etico (CERM 2019-308). Il presente studio è stato condotto in accordo con le linee guida "REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)" e "Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): The TRIPOD statement" [97, 159].

4.4. Analisi statistiche e sviluppo del modello prognostico

Tutte le analisi statistiche sono state condotte mediante i software SPSS versione 21.0 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA) e STATA versione 16.0 (StataCorp LLC, 4905 Lakeway Drive College Station, Texas USA). È stata investigata la normalità della distribuzione delle variabili mediante i test di Shapiro-Wilk e di Kolgomorov-Smirnoff. È stato misurato l'indice di correlazione R per ranghi di Spearman allo scopo di valutare la presenza di una correlazione tra le caratteristiche clinico-patologiche prese in esame. Si tratta di un'analisi statistica non parametrica che restituisce un valore, chiamato ρ di Spearman, capace di misurare il grado di relazione tra due variabili che siano ordinabili.

Lo stimatore di Kaplan-Meier è stato usato per stimare i tassi di DFS, OS e DSS, confrontando i risultati ottenuti mediante il test dei ranghi logaritmici (*logrank test*) e costruendo le curve di sopravvivenza. La regressione univariata di Cox è stata usata per studiare l'associazione tra le variabili prese in esame e gli outcome di sopravvivenza (DFS, OS e DSS). Successivamente è stato costruito un modello dei rischi proporzionali multivariato di Cox al fine di indagare l'associazione tra le diverse variabili prognostiche e la loro influenza sugli outcome. 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).

Il modello prognostico è stato costruito 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 di un modello il più efficiente possibile. In particolare è stato adottato l'approccio denominato "*stepwise regression analysis*", in cui le variabili predittive vengono incluse ed escluse in base al loro contributo predittivo (cioè in base alla forza della correlazione con la variabile dipendente).

Successivamente è stato costruito un nomogramma con il pacchetto *nomocox* presente in STATA 16.0,28 ed è stata condotta una validazione interna stimando l'indice di concordanza adattato con la tecnica del bootstrap. Quest'ultima è uno strumento da applicare alle procedure statistico-inferenziali che permette di attribuire una misura di accuratezza alla stima di una statistica. In questo studio è stato eseguito un bootstrap iterativo mediante l'esecuzione di 1000 repliche.

Infine, la performance del modello sviluppato è stata confrontata con quella dell'ottava edizione dell'AJCC 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 è uno strumento che tiene conto delle censure degli individui in un'analisi di sopravvivenza ed ha lo scopo di valutare la bontà delle previsioni nell'analisi dei dati di durata. L'AIC misura la qualità della stima di un modello statistico tenendo conto sia della bontà di adattamento che della complessità del modello. In

particolare, esso permette di scegliere il modello con la somma degli errori al quadrato più piccola; perciò, la regola è quella di preferire i modelli con il valore di AIC più basso. Il BIC è un altro criterio, strettamente correlato all'AIC, impiegato per la selezione di un modello tra una classe di modelli parametrici con un diverso numero di parametri. Per tutte le analisi condotte, un valore di $p < 0,05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

5. Risultati

5.1. Caratteristiche clinico-patologiche

Il presente studio ha incluso un totale di 211 campioni istologici relativi a soggetti affetti da OTSCC, 135 maschi (64,0%) e 76 femmine (36,0%), con un rapporto maschi/femmine di 1,8:1. Complessivamente, l'età media alla diagnosi era di 64,7 anni (deviazione standard \pm 13,8; range: 23-93 anni). Negli uomini l'età media era di 62,8 anni (deviazione standard \pm 13,9; range: 28-91 anni), mentre nelle donne era pari a 68,1 anni (deviazione standard \pm 12,9; range: 28-93 anni).

Il diametro massimo dei tumori presi in considerazione era di 2,7 cm (deviazione standard \pm 1,4; range: 0,3-9 cm) e i margini di resezione sono risultati positivi in 100 soggetti (47,4%). In base al grading istologico, 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 settima edizione dell'AJCC ha portato a classificare 76 casi come T1 (36,0%), 99 casi come T2 (46,8%), 27 casi come T3 (12,8%) e 9 casi come T4 (4,3%). Riguardo al parametro pN, 132 casi sono risultati negativi per metastasi linfonodali (62,6%), 35 sono stati classificati come N1 (16,6%), 43 casi come N2 (20,4%) e un solo caso come N3 (0,5%). Infine, solo 3 soggetti presentavano metastasi a distanza. Complessivamente, 52 casi sono stati stadiati in Stadio I (24,6%), 59 in Stadio II (28,0%), 47 in Stadio III (22,3%) e 53 in Stadio IV (25,1%). È stata eseguita anche una rivalutazione in base all'ottava edizione dell'AJCC. In particolare, la valutazione del parametro pT ha portato a classificare 61 casi come T1 (28,9%), 100 casi come T2 (47,4%), 41 casi come T3 (19,4%) e 9 casi come T4 (4,3%). Riguardo ai casi positivi per le metastasi linfonodali, 28 casi sono stati classificati come N1 (13,3%), 47 casi come N2 (22,3%) e 4 casi come N3 (1,9%). Complessivamente, 40 casi sono stati stadiati in Stadio I (19,0%), 60 in Stadio II (28,4%), 51 in Stadio III (24,2%) e 60 in Stadio IV (28,4%). Complessivamente, 26 pazienti affetti da OTSCC hanno subito

un cambiamento di stadio a seguito dell'applicazione dell'ultima edizione dell'AJCC, sulla base delle informazioni disponibili riguardo il DOI e l'ENE.

Qui di seguito vengono riportati i risultati riguardanti gli ulteriori parametri morfologici studiati nel presente lavoro. La PNI è risultata esser presente in 83 casi (39,3%); in base al numero di foci, 26 casi erano unifocali (12,3%) e 57 multifocali (27,0%). In base alla localizzazione, la PNI è stata identificata a livello intratumorale in 64 casi (30,3%) e a livello peritumorale in 45 (21,3%). La LVI era presente in solo 30 casi (14,2%), mentre il valore medio del BT è risultato essere di 4,5 buds (DS \pm 5,0; range: 0-26 buds).

Il valore medio della TATE era di 182 eosinofili/mm² (DS \pm 199; range: 0-1097 eosinofili/mm²). A seguito della dicotomizzazione mediante l'impiego del cut-off di 100 eosinofili/mm², 119 casi sono risultati essere ad elevata TATE (56,4%) e 92 mostravano una scarsa TATE (43,6%).

Riguardo al POI, la maggior parte dei tumori ha mostrato la presenza contemporanea di più pattern infiltrativi, in particolare: il POI-1 era presente in 97 casi, il POI-2 in 110 casi, il POI-3 in 124 casi, il POI-4 in 77 casi e infine il POI-5 in 10 casi. Per tutti i casi è stato possibile definire il WPOI, in particolare: il WPOI-1 era presente in 31 casi (14,7%), il WPOI-2 in 32 casi (15,2%), il WPOI-3 in 72 casi (34,1%), il WPOI-4 in 66 casi (31,3%) e infine il WPOI-5 in 10 casi (4,7%). Analogamente, è stato valutato il PPOI in tutti i casi considerati: 71 casi mostravano il PPOI-1 (33,6%), 35 casi il PPOI-2 (16,6%), 68 casi il PPOI-3 (32,2%) e 37 casi il PPOI-4 (17,5%). È bene precisare che il POI-5 non è mai emerso come un pattern prevalente.

Riguardo al TSR, il valore medio di stroma tumorale riscontrato è stato del 25% (DS \pm 22; range: 0-80%). A seguito della dicotomizzazione mediante l'impiego del cut-off del 50%, 180 casi (85,3%) avevano un valore di TSR alto, mentre 31 (14,7%) erano classificati come TSR basso.

Lo studio dell'immunofenotipo ha fatto emergere che il fenotipo immuno-escluso era il più rappresentato, con 109 casi (51,7%), seguito dal fenotipo infiammato con 77 casi (36,5%) e da quello immunodeserto con 25 casi (11,8%).

Per ogni parametro morfologico preso in considerazione è stato studiato il grado di accordo interosservatore mediante la kappa di Cohen, evidenziando una buona riproducibilità delle diverse variabili istopatologiche.

Riguardo ai dati di sopravvivenza, è emerso un periodo di follow-up medio di 50,4 mesi (deviazione standard \pm 36,8; range: 3-120 mesi). In particolare, i risultati hanno mostrato come 104 pazienti (49,3%) erano vivi al momento dell'ultimo follow-up, 94 pazienti (44,5%) erano morti a causa dell'OTSCC, mentre 13 pazienti (6,2%) erano deceduti per cause non correlate al tumore. Riguardo ai dati relativi alle recidive, 69 pazienti (32,7%) hanno avuto una recidiva locoregionale, con un follow-up medio di 52,6 mesi (deviazione standard \pm 37,5; range: 8-120 mesi). I dati clinico-patologici sono brevemente riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti inclusi nel presente studio. n. = numero di casi; DS = Deviazione Standard.

Parametro	n. (%)	Media \pm DS (range)	Kappa di Cohen
Età	-	64,7 \pm 13,8 (23-93)	-
Sesso		-	-
M	135 (64,0%)		
F	76 (36,0%)		
Diametro massimo		2,7 \pm 1,4 (0,3-9)	-
Margini positivi	100 (47,4%)	-	-
Grado istologico		-	-
G1	37 (17,5%)		
G2	115 (54,2%)		
G3	59 (27,7%)		
pT (7^a ed. AJCC)		-	-
T1	76 (36,0%)		
T2	99 (46,8%)		
T3	27 (12,8%)		
T4	9 (4,3%)		
pN (7^a ed. AJCC)		-	-
N0	132 (62,6%)		
N1	35 (16,6%)		
N2	43 (20,4%)		
N3	1 (0,5%)		

pM (7^a ed. AJCC)		-	-
M0	208 (98,6%)		
M1	3 (1,4%)		
Stadio (7^a ed. AJCC)		-	-
I	52 (24,6%)		
II	59 (28,0%)		
III	47 (22,3%)		
IV	53 (25,1%)		
pT (8^a ed. AJCC)		-	-
T1	61 (28,9%)		
T2	100 (47,4%)		
T3	41 (19,4%)		
T4	9 (4,3%)		
pN (8^a ed. AJCC)		-	-
N0	132 (62,6%)		
N1	28 (13,3%)		
N2	47 (22,3%)		
N3	4 (1,9%)		
pM (8^a ed. AJCC)		-	-
M0	208 (98,6%)		
M1	3 (1,4%)		
Stadio (8^a ed. AJCC)		-	-
I	40 (19,0%)		
II	60 (28,4%)		
III	51 (24,2%)		
IV	60 (28,4%)		
PNI		-	0,795
Positivi	83 (39,3%)		
- unifocale	26 (12,3%)		
- multifocale	57 (27,0%)		
- intratumorale	64 (30,3%)		
- peritumorale	45 (21,3%)		
Negativi	128 (60,7%)		
LVI		-	0,776
Positivi	30 (14,2%)		
Negativi	181 (85,8%)		
BT		4,5 ± 5,0 (0-26)	0,690
TATE		182 ± 199 (0-1097)	0,813
Scarsa TATE	92 (43,6%)		
Elevata TATE	119 (56,4%)		
POI		-	0,578
WPOI-1	31 (14,7%)		
WPOI-2	32 (15,2%)		
WPOI-3	72 (34,1%)		

WPOI-4	66 (31,3%)		
WPOI-5	10 (4,7%)		
TSR		25% ± 22 (0-80%)	0,807
TSR basso	31 (14,7%)		
TSR alto	180 (85,3%)		
Immunofenotipo		-	0,886
Escluso	109 (51,7%)		
Infiammato	77 (36,5%)		
Deserto	25 (11,8%)		

5.2. Analisi di correlazione

I risultati dell'analisi di correlazione R per ranghi di Spearman hanno evidenziato la presenza di numerose correlazioni significative tra i diversi parametri clinico-patologici (Tabella 8). Come previsto, è emersa una correlazione tra lo Stadio e il diametro massimo della lesione ($\rho = 0,481$, $p < 0,001$), il pT ($\rho = 0,497$, $p < 0,001$) e il pN ($\rho = 0,789$, $p < 0,001$). I marcatori morfologici indagati nel presente studio sono risultati essere correlati tra di loro; in particolare, la LVI è risultata essere correlata alla PNI ($\rho = 0,355$, $p < 0,001$; $\rho = 0,152$, $p = 0,027$), al WPOI ($\rho = 0,187$, $p = 0,148$), al PPOI ($\rho = 0,148$, $p = 0,032$), al TATE ($\rho = -0,162$, $p = 0,187$) e al TSR ($\rho = -0,176$, $p = 0,010$). È emersa una correlazione tra il BT e la PNI ($\rho = 0,362$, $p < 0,001$; $\rho = 0,285$, $p < 0,001$), il WPOI ($\rho = 0,519$, $p < 0,001$), il PPOI ($\rho = 0,497$, $p < 0,001$) e il TSR ($\rho = -0,283$, $p < 0,001$). Infine, l'immunofenotipo era correlato al TATE ($\rho = -0,152$, $p = 0,027$) e al TSR ($\rho = -0,176$, $p = 0,010$). Per maggiori dettagli si rimanda alla Tabella 8.

Tabella 8. Correlazione R per ranghi di Spearman per le caratteristiche clinico-patologiche prese in esame. n. = numero di foci; peri = peritumorale.

	Età	Sesso	Diam.	Grado	BT	PNI (n.)	PNI (peri)	LVI	TATE	WPOI	PPOI	pT	pN	Stadio	TSR	Immuno fenotipo
Età	$\rho = 1$	-0,179	0,029	-0,222	-0,104	-0,126	0,031	-0,160	-0,110	-0,136	-0,076	-0,025	-0,086	-0,046	-0,043	-0,081
	P = 1	0,009	0,001	0,001	0,131	0,067	0,659	0,020	0,112	0,048	0,273	0,720	0,214	0,503	0,535	0,242
Sesso	$\rho = 1$	0,110	0,109	0,066	0,129	0,29	0,164	0,037	0,119	0,124	0,102	0,108	0,156	-0,033	0,111	
	P = 1	0,117	0,114	0,339	0,062	0,674	0,017	0,592	0,084	0,073	0,141	0,118	0,024	0,639	0,109	
Diam.	$\rho = 1$		0,136	0,128	0,330	0,219	0,053	0,271	0,069	0,121	0,675	0,219	0,481	-0,109	-0,030	
	P = 1		0,053	0,068	0,000	0,002	0,449	0,000	0,329	0,086	0,000	0,002	0,000	0,120	0,668	
Grado	$\rho = 1$			0,179	0,194	0,199	0,158	0,038	0,063	-0,026	0,109	0,230	0,250	-0,076	0,142	
	P = 1			0,009	0,005	0,004	0,022	0,587	0,361	0,704	0,116	0,001	0,000	0,271	0,039	
BT	$\rho = 1$				0,362	0,285	0,112	0,011	0,519	0,497	0,215	0,165	0,276	-0,283	0,130	
	P = 1				0,000	0,000	0,104	0,873	0,000	0,000	0,002	0,017	0,000	0,000	0,059	
PNI (n.)	$\rho = 1$					0,624	0,355	0,037	0,192	0,216	0,266	0,169	0,255	-0,033	0,056	
	P = 1					0,000	0,000	0,595	0,005	0,002	0,000	0,014	0,000	0,636	0,418	
PNI (peri)	$\rho = 1$						0,152	0,014	0,050	0,044	0,156	0,043	0,150	-0,078	-0,025	
	P = 1						0,027	0,834	0,474	0,524	0,024	0,532	0,030	0,259	0,719	
LVI	$\rho = 1$							-0,162	0,187	0,148	0,108	0,124	0,155	-0,176	0,010	
	P = 1							0,019	0,006	0,032	0,116	0,073	0,024	0,010	0,879	

TATE	$\rho = 1$	-0,057	-0,044	0,268	0,047	0,121	0,175	-0,152
	$P = 1$	0,410	0,525	0,000	0,495	0,081	0,011	0,027
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	$\rho = 1$							
	$P = 1$							

5.3. Analisi di sopravvivenza

Sono state eseguite analisi di sopravvivenza per verificare se i diversi parametri presi in considerazione nel presente studio influenzavano la sopravvivenza. Nella Figura 9 sono rappresentate le curve di sopravvivenza ottenute dall'analisi di Kaplan-Meier riguardanti la DSS a 10 anni. I risultati hanno evidenziato la presenza di alcuni parametri significativi rispetto alla sopravvivenza, come: l'ottava edizione dell'AJCC ($p < 0,001$), la PNI ($p = 0,001$), la LVI ($p < 0,001$), la TSR ($p = 0,001$) e l'immunofenotipo ($p < 0,001$), mentre la TATE è risultata essere prossima ai valori di significatività ($p = 0,058$). Risultati analoghi sono stati ottenuti dall'analisi di Cox, in cui è emersa un'associazione tra una riduzione della DSS e un maggior diametro massimo della neoplasia ($p = 0,001$), la presenza dei parametri T4 ($p = 0,011$), N2 ($p < 0,001$) e N3 ($p = 0,001$) e conseguentemente i tumori in Stadio III ($p = 0,045$) e IV ($p < 0,001$). Tra i parametri morfologici studiati, la riduzione della DSS era associata alla presenza della PNI multifocale ($p < 0,001$) o peritumorale ($p = 0,003$), della LVI ($p < 0,001$), del BT ($p < 0,001$), di una scarsa TATE ($p < 0,001$), di un TSR basso ($p = 0,001$) e dell'immunofenotipo deserto ($p < 0,001$) (Tabella 9).

I dati ottenuti dallo studio dell'OS sono risultati sovrapponibili a quelli della DSS a causa del fatto che il numero di pazienti deceduti per cause non legate all'OTSCC era esiguo ($n = 13$). Pertanto, visto il maggior valore prognostico della DSS, non sono state condotte ulteriori analisi in merito all'OS.

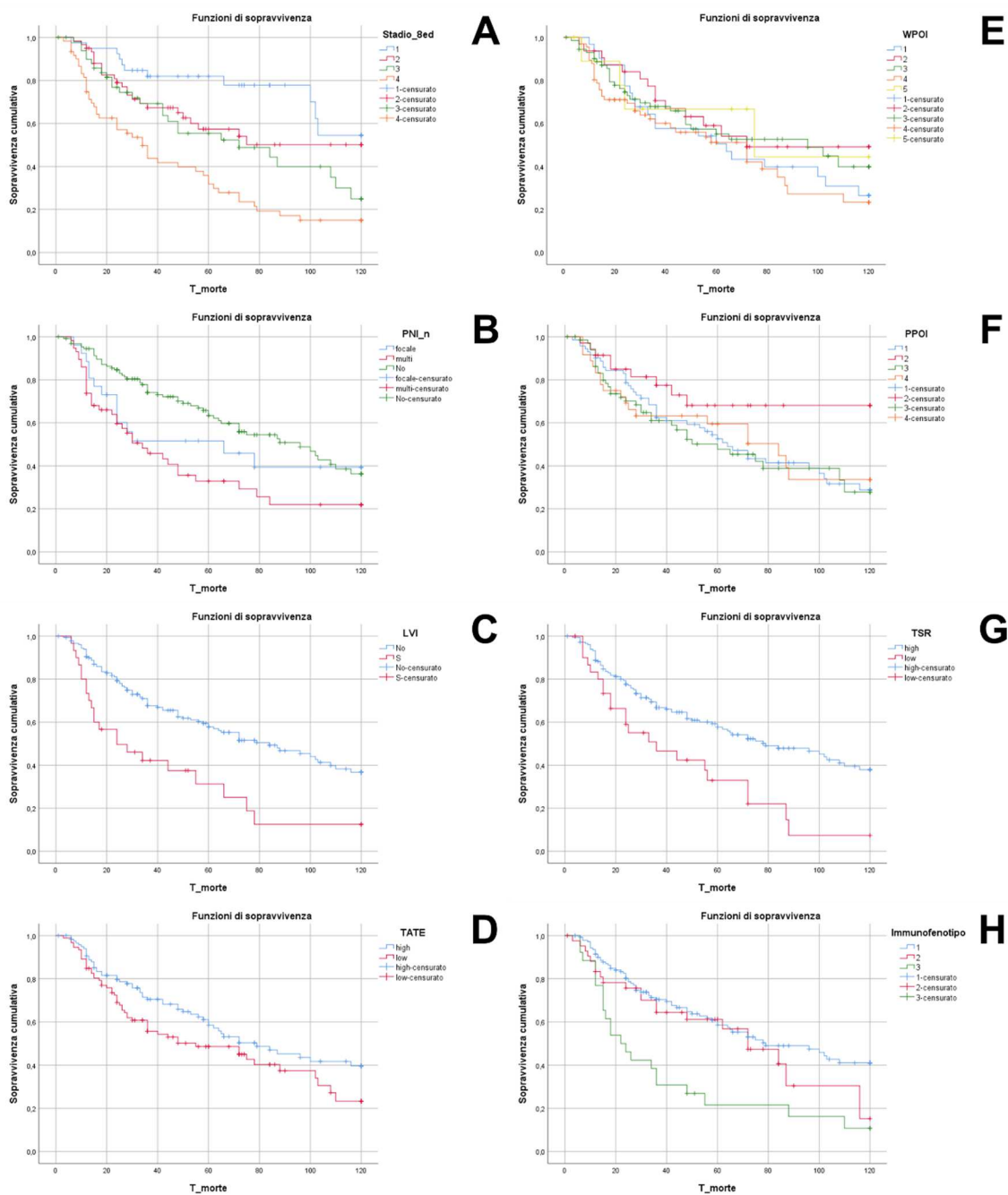


Figura 9. Valutazione mediante analisi di Kaplan-Meier (logrank test) della DSS a 10 anni in base allo Stadio secondo l'ottava edizione dell'AJCC ($p < 0,001$) (A); alla PNI ($p = 0,001$) (B); alla LVI ($p < 0,001$) (C); alla TATE ($p = 0,058$) (D); alla WPOI ($p = 0,465$) (E); alla PPOI ($p = 0,169$) (F); al TSR ($p = 0,001$) (G); e all'immunofenotipo ($p < 0,001$) (H).

Tabella 9. Analisi univariata di Cox per la DSS in pazienti affetti da OTSCC. n. = numero di foci;

H.R. = Hazard Ratio; E.S. = errore standard; I.C. = intervallo di confidenza.

Parametro	H.R.	E.S.	z	P > z 	I.C. 95%
<i>Età</i>	1,0134	0,0079	1,71	0,087	0,9980-1,0290
<i>Sesso (M)</i>	1,8138	0,4245	2,54	0,011	1,1463-2,8697
<i>Diametro max</i>	1,2963	0,0985	3,41	0,001	1,1168-1,5046
<i>Margini positivi</i>	0,9156	0,1920	-0,42	0,674	0,6070-1,3810
Grado istologico					
G2	0,9113	0,2718	-0,31	0,756	0,5078-1,6353
G3	1,7227	0,5347	1,75	0,080	0,9375-3,1656
pT (8^a ed. AJCC)					
T2	1,2624	0,3193	0,92	0,357	0,7689-2,0727
T3	1,6037	0,5021	1,51	0,131	0,8682-2,9624
T4	2,9761	1,2819	2,53	0,011	1,2794-6,9229
pN (8^a ed. AJCC)					
N1	1,2356	0,4021	0,65	0,515	0,6530-2,3383
N2	2,6024	0,5970	4,17	0,000	1,6599-4,0801
N3	5,3513	2,8237	3,18	0,001	1,9024-15,0525
pMI (8^a ed. AJCC)	1,6026	1,1489	0,66	0,511	0,3931-6,5322
Stadio (8^a ed. AJCC)					
II	1,9749	0,7821	1,72	0,086	0,9087-4,2921
III	2,2345	0,8976	2,00	0,045	1,0168-4,9104
IV	4,8987	1,7988	4,33	0,000	2,3851-10,0613
PNI (n.)					
Unifocale	1,7735	0,5421	1,87	0,061	0,9742-3,2287
Multifocale	2,4954	0,5683	4,01	0,000	1,5969-3,8997
PNI (peritumorale)	1,9661	0,4502	2,95	0,003	1,2551-3,0798
LVI (positivo)	2,5469	0,6351	3,75	0,000	1,5621-4,1523
BT	1,0676	0,0180	3,88	0,000	1,0328-1,1036
TATE scarsa ($\leq 100/\text{mm}^2$)	1,5642	0,3238	2,16	0,031	1,0424-2,3470
WPOI					
WPOI-2	0,7871	0,2904	-0,65	0,517	0,3819-1,6221
WPOI-3	0,8679	0,2672	-0,46	0,646	0,4747-1,5869
WPOI-4	1,1908	0,3566	0,58	0,560	0,6621-2,1419
WPOI-5	0,6404	0,4012	-0,71	0,477	0,1876-2,1863
TSR basso (< 50%)	2,2876	0,5704	3,32	0,001	1,4032-3,7294
Immunofenotipo					
Escluso	1,3373	0,3580	1,09	0,278	0,7913-2,2600
Deserto	2,9509	0,7625	4,19	0,000	1,7782-4,8969

Nella Figura 10 sono rappresentate le curve di sopravvivenza ottenute dall'analisi di Kaplan-Meier riguardanti la DFS a 10 anni. I risultati hanno evidenziato che solo l'immunofenotipo influenzava significativamente l'insorgenza di una recidiva ($p = 0,017$). Risultati analoghi sono stati ottenuti dall'analisi univariata di Cox; pertanto, non sono state condotte ulteriori indagini in merito alla DFS.

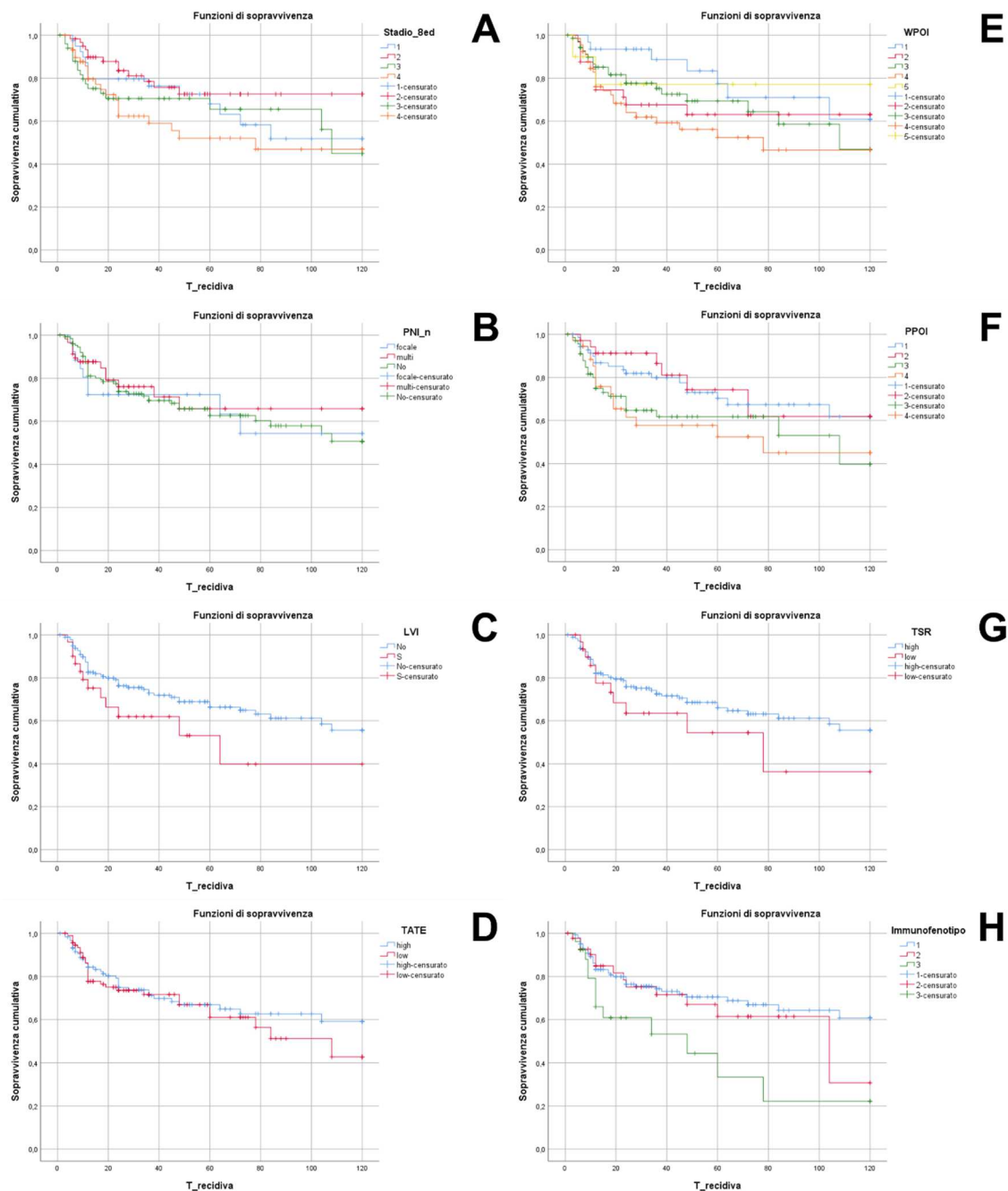


Figura 10. Valutazione mediante analisi di Kaplan-Meier (logrank test) della DFS a 10 anni in base allo Stadio secondo l'ottava edizione dell'AJCC ($p = 0,161$) (A); alla PNI ($p = 0,803$) (B); alla LVI

(p = 0,083) (C); alla TATE (p = 0,503) (D); alla WPOI (p = 0,216) (E); alla PPOI (p = 0,075) (F); al TSR (p = 0,226) (G); e all'immunofenotipo (p = 0,017) (H).

5.4. Sviluppo del modello prognostico e del nomogramma

L'analisi multivariata di Cox e la regressione di tipo stepwise hanno permesso di costruire un modello prognostico impiegando il sottoinsieme ottimale di variabili tra quelle date in partenza (Tabella 10). È stato sviluppato un nomogramma che mostra le probabilità di una DSS a 3 e a 5 anni in base ai risultati del modello prognostico (Figura 11). L'età e il BT sono stati inseriti come variabili continue, mentre lo stadio secondo l'ottava edizione dell'AJCC, l'immunofenotipo e la LVI sono stati inseriti come variabili categoriali. Il modello prognostico ottenuto è quello che ha mostrato di avere l'indice di concordanza di Harrell più alto (0,7336) e i valori più bassi di AIC (855,9606) e BIC (882,7375). È stato infine sviluppato un nomogramma che mostra le probabilità di una DSS a 3 e a 5 anni in base ai risultati del modello prognostico (Figura 11).

Tabella 10. Modello prognostico per la DSS in pazienti affetti da OTSCC. n. = numero di casi; H.R. = Hazard Ratio; E.S. = errore standard; I.C. = intervallo di confidenza.

	H.R.	E.S.	z	P > z 	I.C. 95%
BT	1,0815	0,0314	2,69	0,007	1,0215-1,1449
LVI	2,1540	0,5895	2,80	0,005	1,2597-3,6831
Immunofenotipo					
- Escluso	1,7034	0,4802	1,89	0,059	0,9802-2,9599
- Deserto	1,9113	0,5544	2,23	0,026	1,0825-3,3747
Stadio					
- II-III	1,9830	0,7454	1,82	0,069	0,9492-4,1428
- IV	4,0050	1,5174	3,66	0,000	1,9059-8,4160
Età	1,0211	0,0088	2,42	0,015	1,0040-1,0385
Valutazione di performance del modello					
n.	ll (null)	ll (model)	df	AIC	BIC
210	-450,2963	-419,9803	8	855,9606	882,7375

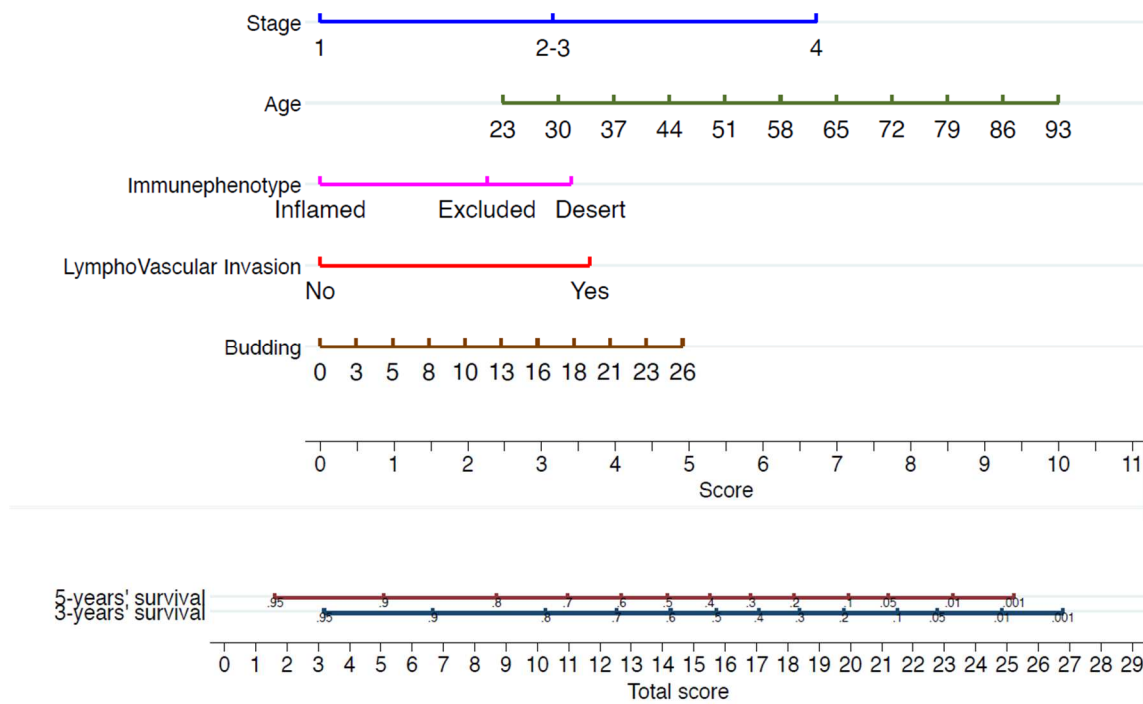


Figura 11. Nomogramma sviluppato dall'analisi multivariata di Cox comprendente le seguenti variabili: Stadio, età, immunofenotipo, LVI e BT.

6. Discussione

L'OTSCC è una neoplasia aggressiva caratterizzata da un elevato tasso di recidive e da una sopravvivenza a 5 anni attorno al 50%. Le attuali strategie terapeutiche, in particolare la chirurgia e la radioterapia, sono orientate in base al livello di estensione della malattia. Per questo motivo è stato sviluppato il sistema di classificazione TNM, il quale rappresenta il principale sistema di stadiazione del carcinoma orale a livello internazionale. Nonostante i miglioramenti ottenuti con l'ottava edizione dell'AJCC, esistono sottogruppi di pazienti classificati all'interno dello stesso stadio che mostrano una risposta ai trattamenti, e conseguentemente una prognosi, molto diversa tra di loro. Numerosi studi hanno evidenziato la necessità di migliorare la capacità di stratificazione dei pazienti affetti da OTSCC, e più in generale da carcinoma orale. Negli ultimi anni è stata posta molta attenzione sullo studio dei fattori prognostici morfologici del tessuto tumorale. Alcuni di questi sono stati inseriti nell'attuale sistema di stadiazione, come il DOI e l'ENE, mentre altri sono in corso di studio in quanto sembrano avere un certo valore prognostico. Le numerose ricerche condotte negli ultimi anni sui marcatori morfologici hanno portato all'individuazione di diversi candidati promettenti. Purtroppo il principale limite della maggior parte degli studi presenti in letteratura è legato al fatto che i diversi marcatori sono stati studiati singolarmente. Pertanto è necessario condurre una validazione contemporanea di più marcatori all'interno di un modello prognostico, affinché si riduca al minimo il rischio di effetti confondenti. Nel presente lavoro è stata indagata una serie di promettenti marcatori morfologici nell'OTSCC per poi costruire un modello prognostico e un nomogramma.

Il BT rappresenta un tentativo di quantificare mediante un parametro morfologico la capacità di una neoplasia ad invadere i tessuti circostanti. Le prime descrizioni dettagliate attestanti la capacità di un tumore di generare piccole isole di cellule dedifferenziate "gemmanti" a livello del fronte invasivo (da cui il termine "budding", da *budding out*) risalgono a circa 30 anni fa [160]. Ciononostante, soltanto negli ultimi anni questo parametro ha dimostrato di essere un promettente marcatore prognostico in numerosi tumori solidi, in particolare il carcinoma del colon-retto [161]. Per quanto

riguarda l'OTSCC, il ruolo prognostico del BT è stato studiato per la prima volta nel 2011, evidenziando la presenza di una forte correlazione tra il numero di buds tumorali e il rischio di sviluppare metastasi linfonodali [142]. Tali risultati sono stati successivamente confermati da altri autori, i quali hanno evidenziato un'associazione significativa tra il BT, la profondità d'invasione tumorale e le metastasi linfonodali. In particolare, la presenza di metastasi linfonodali occulte era associata ad un numero di buds tumorali ≥ 3 , suggerendo la possibilità di utilizzare questo marcatore per individuare quei pazienti che potrebbero beneficiare di un intervento più aggressivo [162]. Chatterjee et al. hanno mostrato come il BT e il pattern d'invasione tumorale erano i parametri maggiormente capaci di predire la comparsa di metastasi linfonodali. Inoltre, il numero di buds tumorali correlava anche con il parametro pN, sebbene il BT non sembrava avere un ruolo prognostico significativo nei casi di OTSCC precoci [163]. Sulla base di tali promettenti risultati, alcuni autori hanno sviluppato dei modelli prognostici incentrati sul BT, come il "iBD scoring model", costruito su una combinazione di BT, profondità d'invasione e grado istologico. Tale modello è risultato capace di stratificare i pazienti affetti da OTSCC in 3 gruppi prognostici e di predire in modo affidabile il rischio di metastasi linfonodali [164]. Un altro modello chiamato "Bd model", basato sulla stratificazione dei pazienti in 3 gruppi prognostici in relazione al numero di buds tumorali, ha dimostrato di poter individuare negli OTSCC precoci quei pazienti con un maggior rischio di recidiva locoregionale e una peggiore OS [165]. Ciò ha confermato un'associazione tra questo parametro istologico e l'aumentato rischio di metastasi linfonodali, con conseguente peggioramento della prognosi. Secondo Sakata et al., l'applicazione di un cut-off di 4 buds tumorali negli OTSCC precoci permette di individuare in modo affidabile quei pazienti a maggior rischio di metastasi linfonodali, con una sensibilità dell'88%, una specificità del 77%, un valore predittivo positivo del 42% e un valore predittivo negativo del 97% [166]. I risultati hanno confermato il ruolo prognostico del BT, evidenziando come la presenza dei buds tumorali si associa ad una prognosi peggiore, come dimostrato dalla regressione univariata di Cox ($p < 0,001$; H.R. = 1,07; 95% C.I. = 1,03-1,10). Le analisi successive hanno permesso di inserire il BT nel modello prognostico e nel

nomogramma come variabile continua, confermando la capacità di questo parametro morfologico di identificare l'aggressività biologica dell'OTSCC. Ciononostante, è necessario validare ulteriormente questo marcatore mediante una standardizzazione del metodo di rilevamento. Inoltre in letteratura sono presenti diversi valori di cut-off e vari sistemi di classificazione a base di cut-off singoli, doppi o tripli, rendendo difficile il confronto tra gli studi. Alcuni autori hanno proposto di standardizzare il tradizionale sistema di grading istologico, notoriamente influenzato da un'estrema variabilità interosservatore, mediante l'incorporazione del BT [153]. Tale approccio, benché promettente, richiede ulteriori studi di validazione su ampie coorti di pazienti prima di poter essere proposto nella pratica clinica. Infine, i risultati del presente lavoro riportano una buona concordanza interosservatore, con una kappa di Cohen di 0,690, in linea con quanto viene riportato in letteratura, suggerendo la buona replicabilità del BT nell'OTSCC [144].

Il valore prognostico del grado istologico tradizionale nell'OTSCC, e più in generale nel carcinoma orale, è altamente dibattuto a causa della mancanza di criteri di valutazione obiettivi e riproducibili. Per tale motivo, nel corso degli anni sono stati proposti per l'OTSCC diversi sistemi alternativi di grading, come quello basato sulla valutazione del WPOI [135]. Il ruolo prognostico del WPOI è stato indagato in uno studio condotto su una coorte di 119 pazienti affetti da OTSCC [167]. I risultati hanno mostrato che le prime 4 categorie di POI non si associavano ad un cambiamento significativo dell'OS. Al contrario, la presenza di noduli tumorali satelliti a > 0,5 mm dal fronte invasivo si associavano ad un aumentato rischio di metastasi linfonodali controlaterali e ad un peggioramento dell'OS. Sebbene quest'ultimo parametro non si sovrapponga perfettamente alla definizione di WPOI-5, i risultati suggeriscono un ruolo prognostico alla presenza di isole di cellule neoplastiche a distanza dal tumore principale. In uno studio multicentrico coinvolgente 479 casi di OTSCC precoci è emerso un ruolo prognostico delle categorie più avanzate del WPOI [168]. In particolare, i tumori con un pattern di tipo "infiltrativo", corrispondente alle categorie WPOI-4 e WPOI-5, avevano una ridotta DSS, con un H.R. di 2,34. A differenza del WPOI, il grado patologico non è emerso come un parametro prognostico rilevante all'analisi multivariata, confermando l'utilità del sistema basato sul POI. Un

recente lavoro condotto su 141 OTSCC precoci ha studiato il ruolo prognostico del fronte invasivo, classificato come “insulare” (*crumb*) o “cordoniforme” (*trabes*) [169]. Sebbene non sia stato usato il sistema del WPOI, i risultati hanno evidenziato che un fronte invasivo frammentato, costituito da cluster più o meno ampi di cellule neoplastiche, era associato ad una prognosi peggiore, corroborando in parte i risultati dei precedenti lavori. I risultati del presente lavoro hanno invece evidenziato la mancanza di un ruolo prognostico significativo del WPOI, come dimostrato dall’analisi di Kaplan-Meier ($p = 0,465$) e dalla regressione univariata di Cox. Uno studio condotto su una piccola coorte di OTSCC precoci ha investigato il ruolo del BT e del WPOI utilizzando sia l’H&E che l’immunoistochimica (pancitocheratina AE1/AE3). Il WPOI ha dimostrato di essere un fattore prognostico negativo indipendente per la DFS e per il rischio di metastasi linfonodali. È emersa anche una correlazione tra il BT e il WPOI, evidenziando una certa sovrapposizione tra questi due parametri, in particolare tra il BT e il WPOI-4. La parziale similitudine tra questi due marcatori morfologici, unita alla maggior capacità predittiva del BT, potrebbe spiegare il motivo del mancato inserimento del WPOI e del PPOI nel modello prognostico e nel nomogramma. Tale ipotesi sembra supportata dai risultati ottenuti dall’analisi di Spearman, che ha evidenziato una correlazione tra il BT e il WPOI ($\rho = 0,519$, $p < 0,001$), il PPOI ($\rho = 0,497$, $p < 0,001$). Infatti sembra che il ruolo prognostico del WPOI e del PPOI sia minimo quando questi parametri vengono associati ad altri fattori morfologici. Altri autori non hanno evidenziato alcuna correlazione tra il BT e il WPOI, probabilmente per il fatto che i pazienti con vari valori di BT ricadevano nelle diverse categorie WPOI [170]. In alternativa, la variabilità nel modo di classificare i tumori in base al POI può aver influenzato significativamente i risultati. Infatti, il principale ostacolo all’impiego del POI nella pratica clinica è la sua riproducibilità. Uno studio condotto da Heerema et al. ha mostrato una moderata riproducibilità di questo parametro, limitandone l’utilità clinica allo stato attuale [134]. Tali risultati sono in linea con quelli riportati nel presente lavoro, che riportano una buona concordanza interosservatore, con una kappa di Cohen di 0,578. È auspicabile che una classificazione migliore e maggiormente condivisa del fronte invasivo, unitamente ad un aumento del suo impiego da parte degli anatomopatologi, possa aumentare la

riproducibilità del POI. A tal proposito, è bene evidenziare che l'ottava edizione dell'AJCC, al fine di semplificare l'analisi anatomopatologica e aumentarne la riproducibilità, consiglia di valutare solamente la presenza o meno del WPOI-5 [94]. Purtroppo questa categoria è in assoluto la meno comune tra i vari tipi di POI, limitandone l'applicabilità.

Negli ultimi anni diversi studi si sono focalizzati sui fattori morfologici del carcinoma orale; ciononostante, il ruolo prognostico della LVI è rimasto ad oggi relativamente poco esplorato. Sebbene la LVI sia stata inclusa dall'ottava edizione dell'AJCC tra i fattori prognostici aggiuntivi, la sua reale importanza dal punto di vista clinico è ancora fonte di dibattito [94]. Diversi autori hanno investigato la LVI nell'OTSCC, suggerendone un ruolo prognostico. I primi lavori hanno riportato risultati contrastanti, verosimilmente a causa del ridotto numero di campioni studiati [171, 172]. Uno studio condotto su una coorte di 339 pazienti ha evidenziato un'associazione tra la LVI e una riduzione dell'OS a 5 anni, sebbene il valore prognostico di questo parametro fosse meno marcato rispetto ad altri marcatori come la PNI e il DOI [173]. Un altro lavoro su 180 pazienti affetti da OTSCC con metastasi linfonodali ha confermato il ruolo prognostico negativo della LVI. In particolare, i pazienti con evidenza di LVI mostravano un peggior controllo locoregionale della malattia e una ridotta OS a 3 anni [174]. Risultati simili sono emersi in uno studio condotto su un piccolo gruppo di pazienti, il quale ha evidenziato anche il peggioramento della prognosi nel caso in cui la LVI fosse associata ad altri fattori istopatologici avversi [175]. I risultati del presente studio hanno confermato il ruolo prognostico negativo della LVI, come dimostrato dall'analisi di Kaplan-Meier ($p < 0,001$) e dalla regressione univariata di Cox ($p < 0,001$; H.R. = 2,55; 95% C.I. = 1,56-4,15). La LVI è stata recentemente studiata anche negli OTSCC precoci. La maggior parte degli studi non è riuscita ad evidenziare un significativo ruolo prognostico di questo parametro nei tumori di Stadio I e II, sia per il rischio di recidiva che per la sopravvivenza [176-178]. Al contrario, Larson et al. hanno recentemente evidenziato come negli OTSCC precoci con un DOI > 4 mm la presenza della LVI era associata ad un aumentato rischio di recidiva locoregionale e ad un peggioramento della DSS e dell'OS [133]. Per quanto riguarda i giovani affetti da OTSCC, il riscontro della LVI sembra essere

più comune, sebbene il suo ruolo prognostico in questo sottogruppo di pazienti sia ancora incerto [48]. In conclusione, dall'analisi della letteratura emerge che la LVI da sola abbia un significato prognostico limitato nell'OTSCC, e più in generale nel carcinoma orale, mentre l'associazione con altri parametri istopatologici avversi ne aumenterebbe il suo valore, permettendo di identificare i tumori con maggiore aggressività biologica. I risultati del presente studio corroborano questa ipotesi, alla luce del fatto che la LVI è stata inserita nel modello predittivo e nel nomogramma. L'impiego della LVI nella pratica clinica è attualmente ostacolato dall'eterogeneità di risultati riportati in letteratura. Tale eterogeneità, confermata anche da una recente revisione sistematica della letteratura, potrebbe risiedere in una serie di problemi di carattere metodologico, come la mancanza di una definizione rigorosa di LVI [179]. Ciò conduce inevitabilmente ad utilizzare differenti approcci per valutare la LVI, limitando la concordanza interosservatore [180]. Proprio per questo motivo la valutazione della LVI è sempre stata considerata difficoltosa nella pratica clinica. Inoltre l'identificazione della LVI nell'OTSCC, e più in generale nel carcinoma orale, può essere influenzata da diverse variabili, come il numero di sezioni esaminate oppure l'eventuale impiego di marcatori immunoistochimici. Perciò, sebbene i risultati suggeriscano una buona concordanza interosservatore (κ di Cohen = 0,776), sono necessarie ulteriori ricerche al fine di validare la replicabilità della LVI nell'OTSCC.

Il carcinoma orale viene considerato, tra i tumori della regione testa-collo, quello con la più alta prevalenza di coinvolgimento delle fibre nervose. Per questo motivo, la PNI è uno dei marcatori istologici più studiati nell'OTSCC, sia con l'H&E che mediante l'impiego di marcatori immunoistochimici. Per quanto riguarda i tumori della lingua, i primi studi condotti sulla PNI si sono concentrati sulla valutazione di questo parametro come valore prognostico negli OTSCC precoci. Complessivamente questi lavori hanno evidenziato su coorti di pazienti più o meno ampie che la PNI si associava ad un aumentato rischio di recidive locoregionali e ad una ridotta sopravvivenza, suggerendo l'importanza di questo parametro nella gestione dei pazienti affetti da OTSCC [181-185]. Uno di questi studi ha anche evidenziato come la dissezione elettiva del collo nei casi cN0 si

associasse ad un aumento della DSS solo in quei pazienti che risultavano positivi alla PNI [185]. Negli ultimi anni numerosi gruppi hanno condotto ricerche sulla PNI, sia singolarmente che in associazione ad altri parametri istopatologici, negli OTSCC. In particolare, la presenza della PNI era associata alla presenza di tumori in stadio più avanzato e di metastasi a livello linfonodale [186, 187]. Inoltre, l'impiego dell'immunoistochimica (anticorpo anti-S-100, specifico per il nerve growth factor) sembra essere una tecnica più sensibile della semplice valutazione in H&E per la diagnosi di PNI, influenzandone anche il valore prognostico [187]. La presenza della PNI negli OTSCC ha dimostrato un valore prognostico negativo indipendente per la DSS e per l'OS in alcuni lavori [188, 189]. Ciononostante, altri studi condotti su ampie coorti di pazienti non sono riusciti a trovare nella PNI un evidente valore prognostico. Un studio condotto su 554 casi di OTSCC non è riuscito a trovare alcun ruolo prognostico della PNI da sola, mentre solo una combinazione di fattori morfologici (PNI, LVI ed ENE) aveva dimostrato la capacità di predire una riduzione significativa della DSS e dell'OS [190]. In un altro lavoro Cracchiolo et al. hanno trovato un'associazione tra la PNI e la presenza di metastasi linfonodali, sebbene solo un'elevata densità di foci di PNI (*foci density*), definita come il rapporto tra il numero di foci di PNI identificati e il numero di sezioni analizzate dall'anatomopatologo, era associata ad una peggior DSS [191]. La possibilità che la semplice presenza della PNI non abbia un ruolo prognostico significativo nel carcinoma orale è suggerita anche dall'ottava edizione dell'AJCC, la quale raccomanda la sottoclassificazione di questo parametro in intratumorale/extratumorale e in base al numero di fibre nervose coinvolte [94]. Per questo motivo nel presente lavoro la PNI è stata valutata come focale/multifocale e in base alla posizione rispetto alla massa tumorale. A differenza delle indicazioni dell'AJCC, la categoria "extratumorale" è stata sostituita da quella "peritumorale", poiché il numero di casi con PNI completamente al di fuori dall'area tumorale (≥ 1 cm dal fronte d'invasione) è risultato essere estremamente esiguo, impedendo ogni valutazione statistica. I risultati hanno confermato il ruolo prognostico della PNI, evidenziando come la presenza di un interessamento multifocale peggiora significativamente la prognosi, come indicato dall'analisi di Kaplan-Meier ($p = 0,001$) e dalla regressione univariata di Cox ($p < 0,001$;

H.R. = 2,50; 95% C.I. = 1,60-3,90). Anche la presenza della PNI peritumorale è associata ad una riduzione della sopravvivenza, come indicato dalla regressione univariata di Cox ($p = 0,003$; H.R. = 1,97; 95% C.I. = 1,25-3,08). Il mancato inserimento della PNI nel modello prognostico e nel nomogramma è verosimilmente conseguente ai risultati ottenuti dalla LVI, anch'essa associata alla capacità invasiva del tumore, come suggerito dalla correlazione tra questi parametri ottenuta dall'analisi di Spearman ($\rho = 0,355$, $p < 0,001$; $\rho = 0,152$, $p = 0,027$). Diversi autori hanno studiato sia la PNI che la LVI, evidenziando come entrambi questi parametri si associno ad un aumentato rischio di metastasi linfonodali e ad una prognosi peggiore [185, 186]. Perciò il ruolo prognostico della LVI, risultando superiore a quello della PNI, ne ha precluso un ulteriore impiego. L'impiego della PNI nella valutazione prognostica del carcinoma orale è ostacolato dall'eterogeneità di risultati riportati in letteratura. Tale eterogeneità potrebbe risiedere in una serie di problemi di carattere metodologico, in particolare la mancanza di una definizione rigorosa di PNI [141]. A conferma di ciò, i dati in letteratura riportano una frequenza molto variabile della PNI nell'OTSCC, andando dal 20% al 70% dei casi [187, 188, 190, 191]. I risultati del presente lavoro riportano una buona concordanza interosservatore, con una kappa di Cohen di 0,795, suggerendo la buona replicabilità della PNI nell'OTSCC. Ciononostante, bisogna evidenziare come i criteri per definire la PNI impiegati nel presente studio non sono unanimemente accettati dagli esperti [140]. Infatti, un'indagine condotta su un gruppo di anatomopatologi esperti dei tumori della regione testa-collo ha evidenziato la mancanza di accordo nella definizione della PNI, mostrando una concordanza interosservatore abbastanza ridotta [141].

Negli ultimi anni è emerso sempre più il ruolo delle cellule del sistema immunitario, in particolare dei TIL, nella progressione neoplastica. Secondo la classificazione proposta da Chen e Mellman, i tumori solidi possono essere classificati in tre diversi immunofenotipi, sulla base della distribuzione dei linfociti T nella massa neoplastica [151]. Sebbene oggi la categorizzazione per immunofenotipo sia ampiamente condivisa, pochi studi hanno esplorato l'eventuale utilità clinica di questa classificazione nei diversi tipi di tumore. Numerose ricerche di immunooncologia hanno dimostrato

l'accuratezza e la riproducibilità dell'individuazione dei TIL, sebbene siano necessari studi di validazione prima di una qualsiasi applicazione nella pratica clinica. Riguardo al ruolo prognostico dei TIL nel carcinoma orale, alcuni studi hanno evidenziato un'associazione tra la presenza di queste cellule e una prognosi favorevole. Infatti si è visto che nel tessuto tumorale la presenza di un'elevata quantità di cellule CD3+, CD4+ o CD8+ (marcatori rispettivamente per tutti i linfociti T, per le cellule T helper e per i linfociti T citotossici) sembra associata ad una prognosi migliore [192-194]. Un altro aspetto rilevante è l'organizzazione spaziale dell'infiltrato linfocitario all'interno del tessuto tumorale [150]. In base a quest'ultimo parametro sono stati proposti diversi metodi di categorizzazione immunofenotipica, sebbene tutti prevedano l'esistenza di un fenotipo caratterizzato dall'assenza di cellule immunitarie sia nella massa tumorale che nello stroma tumorale. Pertanto il ruolo prognostico di questo sottogruppo di tumori, i quali vengono chiamati "deserti", "silenti" o anche "freddi" (*cold tumors*), non è influenzato in maniera significativa dal tipo di classificazione impiegato [156]. Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare l'assenza completa di infiltrato immunitario, come un deficit nel sistema di reclutamento linfocitario da parte delle cellule presentanti l'antigene o un'alterata produzione di citochine. A prescindere dalla causa, diversi studi suggeriscono che questo tipo di tumori hanno una prognosi tendenzialmente sfavorevole [195]. I risultati, recentemente pubblicati [156], hanno confermato questa ipotesi, evidenziando la presenza di un sottogruppo di pazienti (11,8%) caratterizzati da un immunofenotipo deserto e una prognosi significativamente peggiore, come dimostrato dall'analisi di Kaplan-Meier ($p < 0,001$) e dalla regressione univariata di Cox ($p < 0,001$; H.R. = 2,95; 95% C.I. = 1,78-4,90). Le analisi successive hanno permesso di inserire l'immunoprofilo nel modello prognostico e nel nomogramma, confermando la capacità predittiva di questo parametro morfologico nell'OTSCC. Tali risultati sono in accordo con quelli recentemente riportati da Heikkinen et al. in uno studio multicentrico su pazienti affetti da OTSCC [196]. È bene evidenziare che nel modello prognostico e nel nomogramma è stato inserito anche l'immunoprofilo escluso, il quale ha dimostrato di essere un fattore prognostico negativo nell'OTSCC, sebbene in modo meno marcato rispetto all'immunoprofilo deserto ($p = 0,059$; H.R. = 1,70; 95% C.I. = 0,98-

2,96). Questo dato corrobora l'ipotesi secondo cui l'immunofenotipo escluso sia indice della presenza di un infiltrato immunitario che non riesce ad esplicare appieno la sua attività antitumorale, rimanendo confinato esclusivamente nello stroma tumorale. Ciononostante, diversi autori hanno evidenziato la mancanza di una chiara distinzione tra i fenotipi infiammato ed escluso, rendendo arbitraria la definizione di qualsiasi cut-off [151, 152]. A conferma di ciò, i risultati del presente lavoro riportano un'ottima concordanza interosservatore, sebbene limitata alla capacità di distinguere l'immunofenotipo deserto dagli altri due fenotipi, con una kappa di Cohen di 0,886.

Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno posto molta attenzione sul microambiente tumorale, dimostrando come i cambiamenti del compartimento stromale assumano un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione neoplastica [197]. Per tale motivo, numerosi gruppi di ricerca hanno cercato dei marcatori prognostici capaci di rappresentare in maniera accurata e facilmente ripetibile il rapporto biunivoco esistente tra le cellule neoplastiche e quelle stromali. All'interno di questo filone di ricerca è stato sviluppato il TSR, la cui misurazione ha dimostrato di essere affidabile, accurata, rapida ed economica. Fin dai primi studi condotti nel carcinoma del colon-retto è emerso che un'elevata proporzione di stroma tumorale, e quindi un basso valore di TSR, si associa ad un significativo peggioramento della prognosi [198]. Tale risultato, evidenziato in diversi tumori solidi, è stato confermato anche in alcuni lavori condotti sul carcinoma orale. Il primo studio sul TSR è stato condotto su un gruppo di 311 pazienti affetti da OTSCC precoce, dimostrando che un basso TSR era un fattore prognostico negativo per il rischio di recidiva e di morte da neoplasia [199]. Un altro studio su una piccola coorte di soggetti affetti da carcinoma orale ha confermato un peggioramento della DFS a 3 anni in quei soggetti che manifestavano un TSR basso [200]. Recentemente, un lavoro condotto su 254 pazienti affetti da carcinoma orale ha mostrato come i casi con TSR basso avevano una riduzione significativa della DSS e della DFS [149]. I risultati riguardanti il TSR, recentemente pubblicati [154], sono in linea con quelli presenti in letteratura, confermando che un carcinoma con un'alta percentuale di stroma tumorale (TSR basso) ha una prognosi negativa, come dimostrato dall'analisi di Kaplan-Meier ($p = 0,001$) e dalla regressione univariata di Cox ($p = 0,001$; H.R. = 2,29;

95% C.I. = 1,40-3,73). Il mancato inserimento del TSR nel modello prognostico e nel nomogramma è verosimilmente legato ai risultati ottenuti da un altro marcatore incentrato sulla caratterizzazione del microambiente tumorale: l'immunofenotipo. Una possibile spiegazione potrebbe essere data dal fatto che i casi con un maggior infiltrato linfocitario abbiano influenzato negativamente la capacità di quantificare accuratamente la percentuale di stroma tumorale, riducendone il valore apparente. Questa ipotesi è supportata dalla correlazione trovata dall'analisi di Spearman tra l'immunofenotipo e il TST ($\rho = -0,176$, $p = 0,010$). Perciò il ruolo prognostico dell'immunofenotipo, risultando superiore a quello del TSR, ne ha precluso un ulteriore impiego. I risultati ottenuti riportano un'ottima concordanza interosservatore, con una kappa di Cohen di 0,807, suggerendo la buona replicabilità del TSR nell'OTSCC, soprattutto se si impiega una valutazione di tipo dicotomico con un cut-off del 50%. La possibilità di implementare la rilevazione del TSR nella pratica clinica è inoltre supportata da altri vantaggi, come l'economicità e la velocità di esecuzione. L'unica possibile limitazione del TSR potrebbe essere in quei pazienti che hanno già subito chemio-radioterapia a livello della regione testa-collo, in quanto questo tipo di terapie possono alterare significativamente il microambiente tumorale [148].

I granulociti eosinofili sono una sottopopolazione di leucociti circolanti la cui capacità di saper orchestrare la risposta infiammatoria ed immunitaria a livello dei tessuti, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ha attirato l'attenzione dei ricercatori. Sebbene gli eosinofili rappresentino solo l'1-3% di tutti i leucociti circolanti, in alcune condizioni il loro numero può aumentare significativamente, definendo la condizione di eosinofilia [201]. Nel caso in cui si presenti una marcata infiltrazione di eosinofili a livello dei tessuti dell'organismo, si parla di eosinofilia tissutale. Il riscontro occasionale di eosinofilia tissutale a livello di numerosi tumori, definita come TATE, ha suggerito l'ipotesi che questa popolazione leucocitaria possa avere un ruolo nella biologia tumorale [202]. I primi studi sul possibile ruolo della TATE nel carcinoma orale risalgono agli anni '80, sebbene solo a partire dagli anni 2000 l'indagine su questo parametro istopatologico è diventata più sistematica [146, 203, 204]. Complessivamente, i risultati riportati in letteratura riguardo al ruolo

della TATE nel carcinoma orale sono controversi, descrivendo una relazione contraddittoria tra l'eosinofilia tissutale e lo sviluppo del carcinoma. Infatti, sebbene i livelli di TATE sembrano aumentare con la progressione della lesione sia attraverso il grado istologico che lo stadio, il ruolo prognostico dell'ipereosinofilia tissutale rimane ancora controverso [145]. Alcune ricerche suggeriscono un ruolo favorevole della TATE [146, 205], mentre altri studi non sono riusciti a far emergere alcun ruolo prognostico significativo [206, 207]. Uno studio recente condotto su una coorte di 259 OTSCC ha dimostrato un'associazione tra la presenza di TATE e una peggior OS [208]. I risultati del presente lavoro hanno invece evidenziato che la presenza di bassi livelli di TATE si associano ad una prognosi peggiore, come dimostrato dall'analisi di Kaplan-Meier ($p = 0,058$) e dalla regressione univariata di Cox ($p = 0,031$; H.R. = 1,56; 95% C.I. = 1,04-2,34), in accordo con precedenti lavori [146, 205]. Il mancato inserimento della TATE nel modello prognostico e nel nomogramma potrebbe essere conseguente ai risultati ottenuti da altri parametri istopatologici incentrati sulla caratterizzazione del microambiente tumorale, in particolare l'immunofenotipo. Infatti, è possibile che i casi con un maggior infiltrato eosinofilo fossero anche quelli che presentavano con più probabilità un infiltrato linfocitario, sia esso a livello della massa tumorale che dello stroma tumorale. Questa ipotesi è supportata dalla correlazione trovata dall'analisi di Spearman tra l'immunofenotipo e il TATE ($\rho = -0,152$, $p = 0,027$). Perciò il valore prognostico dell'immunofenotipo, risultando superiore a quello della TATE, ne ha precluso un ulteriore impiego. Uno dei fattori che allo stato attuale può limitare l'uso della TATE nella pratica clinica è la grande eterogeneità di risultati presenti in letteratura. La ragione di tale eterogeneità potrebbe risiedere in una serie di problemi di carattere metodologico. Il primo riguarda le diverse modalità di quantificazione della TATE: infatti, il valore di TATE può essere conseguente alla valutazione solo nell'area con la maggior densità di eosinofili oppure può essere dato dalla media dei valori ottenuti dall'osservazione di un certo numero di campi ad alto ingrandimento [157, 206]. Un altro aspetto riguarda i valori di cut-off impiegati per discriminare i pazienti ad elevata TATE da quelli a bassa TATE. Sebbene in letteratura i cut-off di eosinofilia più comunemente usati sono $60/\text{mm}^2$ e $100/\text{mm}^2$,

sono stati proposti molti altri sistemi di classificazione a base di cut-off singoli, doppi o multipli [145]. Infine sono presenti numerosi altri parametri sui quali non viene posta sufficiente attenzione e la cui eterogeneità potrebbe influenzare il risultato finale, come: l'ingrandimento impiegato ($\times 100$, $\times 200$ o $\times 400$), l'uso di eventuali software per il conteggio automatico degli eosinofili, l'impiego di tecniche di colorazione diverse dall'H&E e lo spessore delle sezioni istologiche analizzate [145]. Sebbene i risultati del presente studio suggeriscano un'ottima concordanza interosservatore, con una kappa di Cohen di 0,813, questo dato non viene riportato adeguatamente in letteratura, suggerendo la necessità di ulteriori studi al fine di validare la replicabilità della TATE nell'OTSCC.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro sono complessivamente in linea con i dati presenti in letteratura, confermando l'utilità prognostica dei marcatori morfologici nell'OTSCC. Il modello prognostico sviluppato in questo studio si basa su parametri semplici e sufficientemente definiti dal punto di vista metodologico, permettendo una buona riproducibilità e una ridotta variabilità interosservatore. Inoltre, tale modello ha la possibilità di essere applicato facilmente nelle valutazioni anatomopatologiche poiché si basa su indagini effettuabili su sezioni colorate in H&E, le stesse che vengono impiegate nella pratica clinica quotidiana. I limiti principali del presente lavoro sono rappresentati dalla natura retrospettiva dello studio e dalle dimensioni relativamente ridotte del campione, sebbene la numerosità campionaria sia superiore a quella normalmente considerata negli studi del settore. Da quanto premesso, il modello prognostico e il nomogramma ottenuti rappresentano un promettente passo avanti verso la cosiddetta medicina stratificata. Se confermati da futuri studi di validazione esterna su coorti di pazienti più ampie, i risultati del presente lavoro potrebbero rappresentare un punto di partenza promettente per la conduzione di trial clinici randomizzati aventi lo scopo di individuare quei pazienti affetti da OTSCC che potrebbero beneficiare di protocolli terapeutici più aggressivi.

7. Bibliografia

1. Standring, S., *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. Forty-first edition. ed. 2016, New York: Elsevier Limited. xviii, 1562 pages.
2. Ansarin, M., et al., *Classification of GLOSSECTOMIES: Proposal for tongue cancer resections*. *Head Neck*, 2019. **41**(3): p. 821-827.
3. Calabrese, L., et al., *From Bench to Bedside in Tongue Muscle Cancer Invasion and Back again: Gross Anatomy, Microanatomy, Surgical Treatments and Basic Research*. *Life (Basel)*, 2020. **10**(9).
4. Bassler, R., *Histopathology of different types of atrophy of the human tongue*. *Pathol Res Pract*, 1987. **182**(1): p. 87-97.
5. Han, X.G., J.R. Li, and X. Pi, *[Study on distribution and drainage of lymphatic vessels of tongue]*. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2005. **23**(5): p. 400-3.
6. Edge, S.B. and American Joint Committee on Cancer., *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. 2010, New York: Springer. xiv, 648 p.
7. Gvetadze, S.R. and K.D. Ilkaev, *Lingual lymph nodes: Anatomy, clinical considerations, and oncological significance*. *World J Clin Oncol*, 2020. **11**(6): p. 337-347.
8. Howlader N, et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/. **based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.**
9. *Cancer incidence in five continents. Volume V*. IARC Sci Publ, 1987(88): p. 1-970.
10. Ng, J.H., et al., *Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study*. *Head Neck*, 2017. **39**(2): p. 297-304.
11. Satgunaseelan, L., et al., *The incidence of squamous cell carcinoma of the oral tongue is rising in young non-smoking women: An international multi-institutional analysis*. *Oral Oncol*, 2020. **110**: p. 104875.
12. Lenze, N.R., et al., *Age and risk of recurrence in oral tongue squamous cell carcinoma: Systematic review*. *Head Neck*, 2020.
13. Dhanuthai, K., et al., *A Multicenter Study of Tongue Lesions from Thailand*. *Eur J Dent*, 2020. **14**(3): p. 435-439.
14. Hussein, A.A., et al., *Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review*. *Eur J Cancer*, 2017. **82**: p. 115-127.
15. Yosef, E., et al., *Squamous cell carcinoma of the oral tongue: Distinct epidemiological profile disease*. *Head Neck*, 2020. **42**(9): p. 2316-2320.

16. Paderno, A., R. Morello, and C. Piazza, *Tongue carcinoma in young adults: a review of the literature*. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2018. **38**(3): p. 175-180.
17. Nemes, J.A., et al., *Oral cancer report from Northeastern Hungary*. *Pathol Oncol Res*, 2008. **14**(1): p. 85-92.
18. Joseph, L.J., et al., *Racial disparities in squamous cell carcinoma of the oral tongue among women: a SEER data analysis*. *Oral Oncol*, 2015. **51**(6): p. 586-92.
19. La Vecchia, C., et al., *Trends in oral cancer mortality in Europe*. *Oral Oncol*, 2004. **40**(4): p. 433-9.
20. Jovanovic, A., et al., *Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 1993. **22**(10): p. 459-62.
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. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, *Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence*. *Oral Oncol*, 2005. **41**(3): p. 244-60.
23. Stich, H.F., B.B. Parida, and K.D. Brunnemann, *Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users*. *Int J Cancer*, 1992. **50**(2): p. 172-6.
24. 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.
25. Rehm, J., *Alcohol consumption and mortality. What do we know and where should we go?* *Addiction*, 2000. **95**(7): p. 989-95.
26. Goldstein, B.Y., et al., *Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update*. *Eur J Cancer Prev*, 2010. **19**(6): p. 431-65.
27. Bagnardi, V., et al., *A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(11): p. 1700-5.
28. 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.
29. Boffetta, P. and M. Hashibe, *Alcohol and cancer*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(2): p. 149-56.
30. Ogden, G.R., *Alcohol and oral cancer*. *Alcohol*, 2005. **35**(3): p. 169-73.
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. Sytjanen, K., et al., *Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis*. *Int J Oral Surg*, 1983. **12**(6): p. 418-24.
33. Patel, S.C., et al., *Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(11): p. 1488-94.
34. Kim, Y.J. and J.H. Kim, *Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 7877.
35. Lucenteforte, E., et al., *Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(6): p. 461-7.
36. 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.
37. De Stefani, E., et al., *Dietary patterns and risk of cancer of the oral cavity and pharynx in Uruguay*. *Nutr Cancer*, 2005. **51**(2): p. 132-9.
38. Lissowska, J., et al., *Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland*. *Eur J Cancer Prev*, 2003. **12**(1): p. 25-33.
39. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. *CA Cancer J Clin*, 2002. **52**(4): p. 195-215.
40. van Monsjou, H.S., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma in young patients*. *Oral Oncol*, 2013. **49**(12): p. 1097-102.
41. Mork, J., B. Moller, and E. Glatte, *Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population-based study*. *Oral Oncol*, 1999. **35**(4): p. 360-7.
42. Renkonen, S., et al., *Site-specific familial risk and survival of familial and sporadic head and neck cancer*. *Int J Cancer*, 2017. **141**(3): p. 497-502.
43. Batra, V., et al., *The genetic determinants of smoking*. *Chest*, 2003. **123**(5): p. 1730-9.
44. Campbell, B.R., et al., *Early onset oral tongue cancer in the United States: A literature review*. *Oral Oncol*, 2018. **87**: p. 1-7.
45. Byers, R.M., *Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age*. *Am J Surg*, 1975. **130**(4): p. 475-8.
46. Amsterdam, J.T. and J.G. Strawitz, *Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults*. *J Surg Oncol*, 1982. **19**(2): p. 65-8.
47. Newman, A.N., et al., *Carcinoma of the tongue in persons younger than 30 years of age*. *Arch Otolaryngol*, 1983. **109**(5): p. 302-4.
48. Mascitti, M., et al., *Histological Features and Survival in Young Patients with HPV Negative Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Oral Dis*, 2020.

49. Lee, C.C., et al., *Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients: a matched-pair analysis*. Acta Otolaryngol, 2007. **127**(11): p. 1214-7.
50. de Morais, E.F., et al., *Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review*. J Oral Maxillofac Surg, 2017. **75**(7): p. 1555-1566.
51. Amin, M.B., S.B. Edge, and American Joint Committee on Cancer., *AJCC cancer staging manual*. Eighth edition / ed. 2017, Switzerland: Springer. xvii, 1024 pages.
52. Rahimi, S., *HPV-related squamous cell carcinoma of oropharynx: a review*. J Clin Pathol, 2020. **73**(10): p. 624-629.
53. Barnes, L., *Surgical pathology of the head and neck*. 3rd ed. 2009, New York, NY: Informa Healthcare.
54. Bagan, J., G. Sarrion, and Y. Jimenez, *Oral cancer: clinical features*. Oral Oncol, 2010. **46**(6): p. 414-7.
55. Prince, S. and B.M. Bailey, *Squamous carcinoma of the tongue: review*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999. **37**(3): p. 164-74.
56. 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.
57. 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.
58. Lindberg, R., *Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts*. Cancer, 1972. **29**(6): p. 1446-9.
59. Mascitti, M., et al., *American Joint Committee on Cancer staging system 7th edition versus 8th edition: any improvement for patients with squamous cell carcinoma of the tongue?* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018.
60. Iftikhar, H., et al., *Lymph node ratio as a prognostic marker of oral tongue squamous cell carcinoma: a cohort study*. Ann R Coll Surg Engl, 2020: p. 1-7.
61. Cai, X. and J. Huang, *Distant metastases in newly diagnosed tongue squamous cell carcinoma*. Oral Dis, 2019. **25**(7): p. 1822-1828.
62. Merkx, M.A., et al., *Effectiveness of routine follow-up of patients treated for T1-2N0 oral squamous cell carcinomas of the floor of mouth and tongue*. Head Neck, 2006. **28**(1): p. 1-7.
63. Tilstone, C., *Dentists: a crucial part to play in oral cancer*. Lancet Oncol, 2007. **8**(7): p. 575.
64. Akintoye, S.O. and M. Mupparapu, *Clinical Evaluation and Anatomic Variation of the Oral Cavity*. Dermatol Clin, 2020. **38**(4): p. 399-411.
65. Ong, C.K. and V.F. Chong, *Imaging of tongue carcinoma*. Cancer Imaging, 2006. **6**: p. 186-93.

66. Arya, S., D. Chaukar, and P. Pai, *Imaging in oral cancers*. Indian J Radiol Imaging, 2012. **22**(3): p. 195-208.
67. Li, C., et al., *Magnetic resonance imaging for diagnosis of mandibular involvement from head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112267.
68. 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.
69. Gu, D.H., et al., *CT, MR, (18)F-FDG PET/CT, and their combined use for the assessment of mandibular invasion by squamous cell carcinomas of the oral cavity*. Acta Radiol, 2010. **51**(10): p. 1111-9.
70. Licitra, L., et al., *Evaluation of the benefit and use of multidisciplinary teams in the treatment of head and neck cancer*. Oral Oncol, 2016. **59**: p. 73-79.
71. Calabrese, L., et al., *Compartmental tongue surgery: Long term oncologic results in the treatment of tongue cancer*. Oral Oncol, 2011. **47**(3): p. 174-9.
72. Licitra, L., *Tumori della testa e del collo : integrazione terapeutica nella conservazione della funzione d'organo*. 2011, Milano: Springer. xxiii, 446 p.
73. Ibrahim, S.A., et al., *Elective neck dissection in T1/T2 oral squamous cell carcinoma with N0 neck: essential or not? A systematic review and meta-analysis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2020. **277**(6): p. 1741-1752.
74. Jesse, R.H., et al., *Cancer of the oral cavity. Is elective neck dissection beneficial?* Am J Surg, 1970. **120**(4): p. 505-8.
75. Haddadin, K.J., et al., *Improved survival for patients with clinically T1/T2, N0 tongue tumors undergoing a prophylactic neck dissection*. Head Neck, 1999. **21**(6): p. 517-25.
76. D'Cruz, A.K., et al., *Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(6): p. 521-9.
77. Abu-Ghanem, S., et al., *Elective Neck Dissection vs Observation in Early-Stage Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue With No Clinically Apparent Lymph Node Metastasis in the Neck: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2016. **142**(9): p. 857-65.
78. Schilling, C., et al., *Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer*. Eur J Cancer, 2015. **51**(18): p. 2777-84.
79. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. Radiother Oncol, 2009. **92**(1): p. 4-14.

80. Kundu, S.K. and M. Nestor, *Targeted therapy in head and neck cancer*. *Tumour Biol*, 2012. **33**(3): p. 707-21.
81. Gildener-Leapman, N., R.L. Ferris, and J.E. Bauman, *Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2013. **49**(12): p. 1089-96.
82. *Nature Publishing Group - Prognosis [online]*. Disponibile presso: <https://www.nature.com/subjects/prognosis> [accesso 14/10/2020].
83. Gospodarowicz, M. and B. O'Sullivan, *Prognostic factors in cancer*. *Semin Surg Oncol*, 2003. **21**(1): p. 13-8.
84. Hemingway, H., et al., *Prognosis research strategy (PROGRESS) 1: A framework for researching clinical outcomes*. *Bmj-British Medical Journal*, 2013. **346**.
85. Riley, R.D., et al., *Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 2: Prognostic Factor Research*. *Plos Medicine*, 2013. **10**(2).
86. Steyerberg, E.W., et al., *Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 3: Prognostic Model Research*. *Plos Medicine*, 2013. **10**(2).
87. Hingorani, A.D., et al., *Prognosis research strategy (PROGRESS) 4: Stratified medicine research*. *Bmj-British Medical Journal*, 2013. **346**.
88. Hemingway, H., et al., *Prognosis of angina with and without a diagnosis: 11 year follow up in the Whitehall II prospective cohort study*. *BMJ*, 2003. **327**(7420): p. 895.
89. Ford, E.S., et al., *Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(23): p. 2388-98.
90. Buchbinder, R. and D. Jolley, *Population based intervention to change back pain beliefs: three year follow up population survey*. *BMJ*, 2004. **328**(7435): p. 321.
91. *WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001 [online]*. Disponibile presso: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm> [accesso 16/10/2020].
92. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* *Curr Opin HIV AIDS*, 2010. **5**(6): p. 463-6.
93. Lydiatt, W.M., et al., *Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(2): p. 122-137.
94. Amin, M.B., S.B. Edge, and American Joint Committee on Cancer, *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. ed. 2017, Switzerland: Springer. xvii, 1024 pages.
95. Kujan, O., B. van Schaijik, and C.S. Farah, *Immune Checkpoint Inhibitors in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders: A Systematic Review*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(7).

96. Mascitti, M., et al., *Beyond Head and Neck Cancer: The Relationship Between Oral Microbiota and Tumour Development in Distant Organs*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 232.
97. McShane, L.M., et al., *REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)*. *Br J Cancer*, 2005. **93**(4): p. 387-91.
98. Moons, K.G., et al., *Prognosis and prognostic research: what, why, and how?* *BMJ*, 2009. **338**: p. b375.
99. Royston, P., et al., *Prognosis and prognostic research: Developing a prognostic model*. *BMJ*, 2009. **338**: p. b604.
100. Steyerberg, E.W., *Clinical prediction models : a practical approach to development, validation, and updating*. *Statistics for biology and health*. 2009, New York: Springer. xxviii, 497 p.
101. Altman, D.G., et al., *Prognosis and prognostic research: validating a prognostic model*. *BMJ*, 2009. **338**: p. b605.
102. Marchevsky, A.M. and R. Gupta, *Interobserver diagnostic variability at "moderate" agreement levels could significantly change the prognostic estimates of clinicopathologic studies: evaluation of the problem using evidence from patients with diffuse lung disease*. *Ann Diagn Pathol*, 2010. **14**(2): p. 88-93.
103. Trusheim, M.R., E.R. Berndt, and F.L. Douglas, *Stratified medicine: strategic and economic implications of combining drugs and clinical biomarkers*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(4): p. 287-93.
104. Franceschi, D., et al., *Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue*. *Am J Surg*, 1993. **166**(4): p. 360-5.
105. Mitchell, R. and L.E. Crighton, *The management of patients with carcinoma of the tongue*. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1993. **31**(5): p. 304-8.
106. Kalnins, I.K., et al., *Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity*. *Am J Surg*, 1977. **134**(4): p. 450-4.
107. Fein, D.A., et al., *Carcinoma of the oral tongue: a comparison of results and complications of treatment with radiotherapy and/or surgery*. *Head Neck*, 1994. **16**(4): p. 358-65.
108. Kirita, T., et al., *Risk factors for the postoperative local recurrence of tongue carcinoma*. *J Oral Maxillofac Surg*, 1994. **52**(2): p. 149-54.
109. Lee, C.C., et al., *Recommendation for incorporation of a different lymph node scoring system in future AJCC N category for oral cancer*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 14117.

110. Patel, S.G., et al., *Lymph node density in oral cavity cancer: results of the International Consortium for Outcomes Research*. Br J Cancer, 2013. **109**(8): p. 2087-95.
111. Gil, Z., et al., *Lymph node density is a significant predictor of outcome in patients with oral cancer*. Cancer, 2009. **115**(24): p. 5700-10.
112. Safi, A.F., et al., *The importance of lymph node ratio for locoregional recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue*. J Craniomaxillofac Surg, 2017. **45**(7): p. 1058-1061.
113. Lieng, H., et al., *Important prognostic significance of lymph node density in patients with node positive oral tongue cancer*. ANZ J Surg, 2016. **86**(9): p. 681-6.
114. Ong, W., et al., *Prognostic significance of lymph node density in squamous cell carcinoma of the tongue*. Head Neck, 2016. **38 Suppl 1**: p. E859-66.
115. Hingsammer, L., et al., *The influence of lymph node ratio on survival and disease recurrence in squamous cell carcinoma of the tongue*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2019. **48**(7): p. 851-856.
116. Huang, T.H., K.Y. Li, and W.S. Choi, *Lymph node ratio as prognostic variable in oral squamous cell carcinomas: Systematic review and meta-analysis*. Oral Oncol, 2019. **89**: p. 133-143.
117. Hilly, O., et al., *Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years*. Oral Oncol, 2013. **49**(10): p. 987-90.
118. Vargas, H., et al., *More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women*. Laryngoscope, 2000. **110**(10 Pt 1): p. 1623-6.
119. Farhood, Z., et al., *Does anatomic subsite influence oral cavity cancer mortality? A SEER database analysis*. Laryngoscope, 2019. **129**(6): p. 1400-1406.
120. Cui, M., et al., *Prognostic Value of a Family History of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma: A Matched-Pair Study*. Laryngoscope, 2019.
121. Day, G.L. and W.J. Blot, *Second primary tumors in patients with oral cancer*. Cancer, 1992. **70**(1): p. 14-9.
122. Alonso, J.E., et al., *A population-based analysis of verrucous carcinoma of the oral cavity*. Laryngoscope, 2018. **128**(2): p. 393-397.
123. Schuch, L.F., et al., *Basaloid squamous cell carcinoma: a 31-year retrospective study and analysis of 214 cases reported in the literature*. Oral Maxillofac Surg, 2020. **24**(1): p. 103-108.
124. Alotaiby, F., et al., *Unusual Papillary Squamous Cell Carcinoma of the Tip of Tongue Presenting in a Patient Status Post Heart Transplant*. Anticancer Res, 2018. **38**(7): p. 4203-4206.

125. Biradar, M.V., et al., *Spindle cell carcinoma of the tongue: a rare variant of squamous cell carcinoma*. *Ecancermedicalsecience*, 2014. **8**: p. 447.
126. Rawal, Y.B. and K.M. Anderson, *Adenosquamous Carcinoma of the Tongue*. *Head Neck Pathol*, 2018. **12**(4): p. 576-579.
127. Merz, H., et al., *Schmincke's Tumor, Carcinoma of the Base of the Tongue c T1-2, cN2c M0 - A Case Report*. *Case Rep Oncol*, 2010. **3**(1): p. 77-82.
128. Thavaraj, S., et al., *Carcinoma cuniculatum arising in the tongue*. *Head Neck Pathol*, 2012. **6**(1): p. 130-4.
129. El-Naggar, A.K., et al., *WHO classification of head and neck tumours*. World Health Organization classification of tumours, 4th edition. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 347 pages.
130. Wagner, V.P., et al., *Bryne's grading system predicts poor disease-specific survival of oral squamous cell carcinoma: a comparative study among different histologic grading systems*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017. **123**(6): p. 688-696.
131. Dirven, R., et al., *Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer*. *Oral Oncol*, 2017. **74**: p. 30-33.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. Brandwein-Gensler, M., et al., *Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(5): p. 676-88.
136. 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.
137. Helliwell, T. and J.A. Woolgar, *Standards and datasets for reporting cancers: Dataset for histopathology reporting of mucosal malignancies of the oral cavity*. 2013, Royal College of Pathologists: London.

138. Kamat, M., et al., *A comprehensive review of surgical margin in oral squamous cell carcinoma highlighting the significance of tumor-free surgical margins*. J Cancer Res Ther, 2019. **15**(3): p. 449-454.
139. 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.
140. Liebig, C., et al., *Perineural invasion in cancer: a review of the literature*. Cancer, 2009. **115**(15): p. 3379-91.
141. Chi, A.C., et al., *Interobserver Variation Among Pathologists in Evaluating Perineural Invasion for Oral Squamous Cell Carcinoma*. Head Neck Pathol, 2016. **10**(4): p. 451-464.
142. 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.
143. 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.
144. Almangush, A., et al., *Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. Br J Cancer, 2018. **118**(4): p. 577-586.
145. Mascitti, M., et al., *Tumour-associated tissue eosinophilia (TATE) in oral squamous cell carcinoma: a comprehensive review*. Histol Histopathol, 2020: p. 18250.
146. Dorta, R.G., et al., *Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas*. Histopathology, 2002. **41**(2): p. 152-7.
147. Ramamonjisoa, N. and E. Ackerstaff, *Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor-Stroma Interaction by Non-invasive Preclinical Imaging*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 3.
148. van Pelt, G.W., et al., *Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations*. Virchows Arch, 2018. **473**(4): p. 405-412.
149. 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.
150. 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.
151. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
152. Cogdill, A.P., M.C. Andrews, and J.A. Wargo, *Hallmarks of response to immune checkpoint blockade*. Br J Cancer, 2017. **117**(1): p. 1-7.
153. 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.

154. Mascitti, M., et al., *The addition of tumour-stroma ratio to the 8th AJCC staging system improves survival prediction in oral tongue squamous cell carcinoma*. Histopathology, 2020.
155. Hendry, S., et al., *Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors*. Adv Anat Pathol, 2017. **24**(6): p. 311-335.
156. Troiano, G., et al., *The immune phenotype of tongue squamous cell carcinoma predicts early relapse and poor prognosis*. Cancer Med, 2020.
157. Alkhabuli, J.O. and A.S. High, *Significance of eosinophil counting in tumor associated tissue eosinophilia (TATE)*. Oral Oncol, 2006. **42**(8): p. 849-50.
158. General Assembly of the World Medical, A., *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. J Am Coll Dent, 2014. **81**(3): p. 14-8.
159. Collins, G.S., et al., *Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement*. Ann Intern Med, 2015. **162**(1): p. 55-63.
160. Hase, K., et al., *Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer*. Dis Colon Rectum, 1993. **36**(7): p. 627-35.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. 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.

165. 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.
166. 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.
167. Yang, T.L., et al., *Association of tumor satellite distance with prognosis and contralateral neck recurrence of tongue squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2008. **30**(5): p. 631-8.
168. 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.
169. 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.
170. 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.
171. Hosal, A.S., O.F. Unal, and A. Ayhan, *Possible prognostic value of histopathologic parameters in patients with carcinoma of the oral tongue*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 1998. **255**(4): p. 216-9.
172. Chen, Y.W., et al., *Histopathological factors affecting nodal metastasis in tongue cancer: analysis of 94 patients in Taiwan*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008. **37**(10): p. 912-6.
173. Goodman, M., et al., *Invasion characteristics of oral tongue cancer: frequency of reporting and effect on survival in a population-based study*. Cancer, 2009. **115**(17): p. 4010-20.
174. Cassidy, R.J., et al., *Association of Lymphovascular Space Invasion With Locoregional Failure and Survival in Patients With Node-Negative Oral Tongue Cancers*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2017. **143**(4): p. 382-388.
175. Subramaniam, N., et al., *Factors Affecting Survival in Surgically Salvaged Locoregional Recurrences of Squamous Cell Carcinoma of the Tongue*. J Oral Maxillofac Surg, 2018. **76**(5): p. 1133 e1-1133 e6.
176. 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.
177. Ganly, I., et al., *Long-term regional control and survival in patients with "low-risk," early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without*

- postoperative radiation: the importance of tumor thickness.* Cancer, 2013. **119**(6): p. 1168-76.
178. Masood, M.M., et al., *Depth of invasion on pathological outcomes in clinical low-stage oral tongue cancer patients.* Oral Dis, 2018. **24**(7): p. 1198-1203.
179. Huang, S., et al., *Impact of lymphovascular invasion in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2020.
180. Beggan, C., et al., *Pattern of invasion and lymphovascular invasion in squamous cell carcinoma of the floor of the mouth: an interobserver variability study.* Histopathology, 2016. **69**(6): p. 914-920.
181. O'Brien, C.J., et al., *Surgical treatment of early-stage carcinoma of the oral tongue--wound adjuvant treatment be beneficial?* Head Neck Surg, 1986. **8**(6): p. 401-8.
182. Lydiatt, D.D., et al., *Treatment of stage I and II oral tongue cancer.* Head Neck, 1993. **15**(4): p. 308-12.
183. Sparano, A., et al., *Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer.* Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **131**(4): p. 472-6.
184. D'Cruz, A.K., et al., *Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial.* Head Neck, 2009. **31**(5): p. 618-24.
185. 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.
186. de Matos, F.R., et al., *Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue.* J Oral Maxillofac Surg, 2012. **70**(7): p. 1703-10.
187. 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.
188. Durr, M.L., et al., *Oral tongue squamous cell carcinoma in never-smokers: analysis of clinicopathologic characteristics and survival.* Otolaryngol Head Neck Surg, 2013. **149**(1): p. 89-96.
189. 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.
190. Lin, Y.T., et al., *Triple-positive pathologic findings in oral cavity cancer are related to a dismal prognosis.* Laryngoscope, 2015. **125**(9): p. E300-5.

191. Cracchiolo, J.R., et al., *Patterns of recurrence in oral tongue cancer with perineural invasion*. Head Neck, 2018. **40**(6): p. 1287-1295.
192. Fang, J., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 375.
193. 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.
194. 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.
195. 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.
196. 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.
197. Schiavoni, G., L. Gabriele, and F. Mattei, *The tumor microenvironment: a pitch for multiple players*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 90.
198. 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.
199. Almangush, A., et al., *Prognostic impact of tumour-stroma ratio in early-stage oral tongue cancers*. Histopathology, 2018. **72**(7): p. 1128-1135.
200. Niranjana, 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.
201. Chusid, M.J., *Eosinophils: Friends or Foes?* J Allergy Clin Immunol Pract, 2018. **6**(5): p. 1439-1444.
202. Sakkal, S., et al., *Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable?* Curr Med Chem, 2016. **23**(7): p. 650-66.
203. Lowe, D. and C.D. Fletcher, *Eosinophilia in squamous cell carcinoma of the oral cavity, external genitalia and anus--clinical correlations*. Histopathology, 1984. **8**(4): p. 627-32.
204. Lorena, S.C., et al., *Morphometric analysis of the tumor associated tissue eosinophilia in the oral squamous cell carcinoma using different staining techniques*. Histol Histopathol, 2003. **18**(3): p. 709-13.

205. Debta, P., et al., *Evaluation of Prognostic Significance of Immunological Cells (Tissue Eosinophil and Mast Cell) Infiltration in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Journal of Cancer Science & Therapy, 2011. **3**: p. 201-204.
206. Oliveira, D.T., et al., *Eosinophils may predict occult lymph node metastasis in early oral cancer*. Clin Oral Investig, 2012. **16**(6): p. 1523-8.
207. Peurala, E., et al., *Eosinophilia is a favorable prognostic marker for oral cavity and lip squamous cell carcinoma*. APMIS, 2018. **126**(3): p. 201-207.
208. De Paz, D., et al., *Clinical Implications of Tumor-Associated Tissue Eosinophilia in Tongue Squamous Cell Carcinoma*. Laryngoscope, 2019. **129**(5): p. 1123-1129.