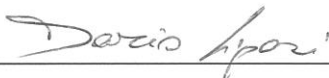


PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

Cognome/Surname	LIPARI
Nome / Name	DARIO
Titolo del progetto / Project title	Microbiota e carcinogenesi del cavo orale: correlazioni patogenetiche
Corso di dottorato / PhD	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
Firma del candidato / Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

I tumori testa-collo originano dalla cavità nasale ai seni paranasali, la cavità orale, faringe, orofaringe laringe e ghiandole salivari. Essi rappresentano il sesto tumore maligno più diffuso al mondo (Mariam Z. Kakabadze, 2020).

Studi mostrano come ogni anno si riscontrino circa 657.000 nuovi casi di tumori del cavo orale e faringe, con più di 330.000 morti ogni anno (Pablo H Montero, 2015).

L'American cancer society ha stimato che nel 2020 saranno diagnosticati, approssimativamente, 53,260 tumori al cavo orale e faringe; il che corrisponderebbe a circa 148 nuovi casi al giorno (Rebecca L Siegel, 2020).

I fattori di rischio primari per lo sviluppo del carcinoma squamoso del cavo orale (OSCC) sono il consumo di tabacco, l'assunzione di grandi quantitativi di bevande alcoliche, la scarsa igiene orale ed errate abitudini alimentari. Oltre a questi, vari virus e batteri sono sempre più frequentemente indicati nell'eziopatogenesi dell'OSCC. Si stima che circa il 20% di tutte le neoformazioni maligne umane siano associate ad infezioni virali o batteriche (Howley, 2015);

più di 700 tipi di batteri coesistono, fisiologicamente, nella cavità orale; tra questi il red complex, gruppo di batteri composto da *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, è tra i fattori principali nello sviiluppo della patologia paradontale.

Questi tre sono batteri anaerobi Gram – negativi; possono esprimere fattori di virulenza in grado d'interferire con le difese immunitarie e invadere e distruggere il tessuto peridontale e le funzioni immunitarie dell'ospite (C Bodet, 2007); inoltre i generi associati a fasi avanzate di tumore sono *Acinetobacter* e *Fusobacterium*; suggerendo che il microbiota possa essere implicato nella genesi e sviluppo dell'OSCC (Zhen Zhang, 2019)

Si stima che circa il 95% dei carcinomi testa – collo sia costituito da OSCC e tra questi il più frequente è quello ad insorgenza nel cavo orale.

In Italia, l'incidenza media è di 8,44 nuovi casi/anno ogni 100.000 abitanti tra gli uomini e 2,22 tra le donne, con grandi variazioni d'incidenza tra le varie regioni, sulla base, anche, degli stili di vita. (Lorenzo Lo Muzio, 2014).

Il Carcinoma del cavo orale interessa prevalentemente individui della V – VI decade di vita, anche se negli ultimi anni l'età d'insorgenza sta calando drasticamente, con l'aggravante che non si hanno miglioramenti prognostici o terapeutici per gli stadi avanzati. Complessivamente la sopravvivenza a 5 anni è del 44%. Se la diagnosi avviene in fase precoce, invece, la sopravvivenza a 5 anni si attesta sull'80 – 90 %, mentre precipita al 20% nei soggetti con stadio di malattia avanzata.

L'incidenza di un secondo tumore primitivo è stato calcolato intorno al 3 – 7% / anno, il che rappresenta un valore superiore a quello di tutte le altre neoplasie; questa osservazione ha portato a postulare l'ipotesi della “cancerizzazione di campo”, ovvero che singoli tumori primitivi multipli si possano sviluppare in maniera indipendente a livello delle vie aeree e digestive superiori a seguito di anni di esposizione cronica a cancerogeni da parte della mucosa. Un individuo che sopravvive per 5 anni a seguito di una neoplasia primitiva del cavo orale, ha una probabilità che può arrivare al 35% di sviluppare un secondo tumore primitivo in questo lasso di tempo.

2 - Descrizione del progetto / Project

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo del progetto è quello di indagare e valutare la correlazione tra il microbiota del cavo orale e lo sviluppo di un OSCC, considerando anche gli effetti della dieta mediterranea sui fattori protettivi o favorevoli il suo sviluppo.

In particolare si esaminerà, per quanto possibile, la morfologia delle lesioni mediante studi di dermatoscopia ed i pattern ottenuti saranno correlati al microbiota studiato tramite NGS. Si valuterà altresì la possibilità di utilizzare i sopra menzionati pattern per lo screening delle lesioni e per la valutazione della gravità della lesione con metodiche sempre meno invasive. Le metodiche invasive si potrebbero invece applicare solo per i casi che realmente necessitino di approfondimenti.

Sulla base della presupposta implicazione batterica, sugli isolati dopo identificazione sarà

Eseguito l'antibiogramma con l'intento di sottoporre il paziente ad una terapia mirata che potrebbe ridurre la gravità della lesione.

MATERIALI E METODI

Prima della raccolta dei campioni, ai pazienti verrà fornito il modulo per il consenso informato contenente le delucidazioni sulle finalità dello studio e verrà chiesto loro di apporvi una firma; verrà fornito anche un questionario da compilare al fine di ottenere dati riguardanti il paziente, quali: età, sesso, stato socio economico, uso di alcool, droghe, fumo (e la frequenza di assunzione), familiarità per OSCC o per altre neoplasie, pregresse infezioni da agenti infettivi, assunzione di farmaci negli ultimi mesi.

Lo studio prevede la valutazione di n° 10-20 pazienti, di ambo i sessi con pregressa storia di OSCC e un egual numero di pazienti, quali gruppo di controllo, ossia privi di lesioni riconducibili a OSCC, quanto più omogeneo possibile al primo, per età e sesso,.

Da ogni paziente verrà prelevato n° 1 biopsia in sede di OSCC o di precancerosi e n° 1 biopsia su mucosa sana; verrà inoltre effettuato un tampone mucosale e lo studio dermatoscopico delle lesioni e della mucosa.

I pezzi biotici verranno suddivisi in due parti, ciascuna delle quali sarà utilizzata per effettuare:

1. Valutazione clinico/dermatoscopica della mucosa del cavo orale, mediante uso di dermatoscopia manuale. I principali pattern saranno fotografati affinché possano essere correlati ai dati microbiologici e si possano tracciare i possibili segni patognomici di malattia.
2. Valutazione, mediante esame istologico, del processo infiammatorio e dell'eventuale stadiazione della lesione cancerogena; individuazione degli stipiti cellulari coinvolti. Il campione verrà conservato in formalina ed opportunamente trattato e colorato per l'esecuzione delle indagini istopatologiche.
3. Valutazione del microbiota residente nel cavo orale e di eventuali microrganismi transitori possibilmente implicati nella cancerogenesi. Il microbiota sarà valutato tramite NGS (Next Generation Sequencing); la presenza di eventuali microrganismi transitori quali causa di cancerogenesi vede coinvolto principalmente varianti oncogene dell'HPV. Particolare rilievo sarà attribuito alla co-presenza HPV - "red complex" (Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia e Treponema denticola) mediante la metodica NGS.
4. Valutazione sul possibile ruolo svolto dal microbiota nella formazione e sviluppo dell'OSCC. In base ai risultati ottenuti si valuteranno i principali geni responsabile della virulenza microbica e i geni implicati nella carcinogenesi.
5. Esecuzione degli antibiogrammi secondo le linee EUCAST per le specie ritenute responsabili della carcinogenesi al fine di valutare la farmaco resistenza dei batteri isolati, per una terapia



mirata. Al termine della terapia verrà eseguito un nuovo prelievo orale per la valutazione dello stato di eradicazione.

6. Valutazione delle mutazioni nel recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), che risulta overespresso in un'alta percentuale dei carcinomi a cellule squamose ed è utilizzato come bersaglio nel trattamento della malattia.
7. Valutazioni delle mutazioni in p53. Per il rilevamento delle mutazioni nella proteina p53 sarà utilizzato il test Single-Stranded Conformational Polymorphism (SSCP), verranno amplificati mediante PCR gli esoni 5-9 del gene p53.
8. L'analisi statistica sarà condotta mediante metodi di ordinamento non vincolanti e vincolanti. Nel primo caso si utilizzano le informazioni relative alle abbondanze dei generi le così dette OTU; il metodo principalmente utilizzato è il PCA (Principal Component Analysis) che consente di individuare eventuali pattern nei dati, ridurre la dimensione e rappresentarli in grafici bidimensionali. I metodi vincolati prendono in considerazione variabili ambientali associate al dataset, come sesso, età, salute dei soggetti, informazioni sui campioni prelevati etc. Tra questi il metodo principalmente utilizzato sarà la RDA che consente di determinare le variabili ambientali, che permettono di spiegare la massima percentuale di varianza dei dati originali; essa si può considerare un'estensione della PCA; essa, inoltre, permette di mostrare la correlazione tra ciascun genere (o OTU) e ciascuna variabile ambientale.

TIMESHEET

Novembre 2020 – Febbraio 2020: Revisione della letteratura, formulazione del questionario e del consenso informato da sottoporre ai pazienti.

Marzo 2021 – Novembre 2021: Arruolamento pazienti, somministrazione dei questionari e consenso informato; screening dermatoscopico, acquisizione materiale del cavo orale prelevato tramite tampone e prelievi biotici.

Dicembre 2021 – Settembre 2021:

- Isolamento dei ceppi presenti ritenuti responsabili della carcinogenesi
- Esecuzione degli antibiogrammi e valutazione delle eventuali resistenze presenti*
- Processazione degli isolati ottenuti mediante NGS
- Valutazione dei polimorfismi genici dei pazienti
- Valutazione istopatologica dei processi flogistici in corso
- Valutazione dei risultati e correlazioni con la clinica
- Somministrazione terapia mirata ai pazienti positivi*
- Rivalutazione dei pazienti posti a follow –up (ogni tre / sei mesi)



Ottobre 2021 – Novembre 2022:

- Rivalutazione clinica dei soggetti posti a follow-up (ogni tre / sei mesi)
- Elaborazione dei dati ottenuti
- Analisi statistica dei risultati
- Compilazione elaborato finale

3 - Bibliografia / References

1. C Bodet, F. C. (2007). Pathogenic potential of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathol Biol*, 154 - 62.
2. Howley, P. M. (2015). Gordon Wilson Lecture: Infectious Disease Causes of Cancer: Opportunities for Prevention and Treatment. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 117 - 132.
3. Lorenzo Lo Muzio, S. P. (2014). *IL CARCINOMA ORALE*. Grillieditore.
4. Mariam Z. Kakabadze, T. P. (2020). Oral microbiota and oral cancer: Review. *Oncology Reviews*, 129 - 134. doi:10.4081/oncol.2020.476
5. Pablo H Montero, S. G. (2015). Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*, 491 - 508. doi:10.1016/j.soc.2015.03.006.
6. Rebecca L Siegel, K. D. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 7 - 30. doi:10.3322/caac.21590
7. Zandonà, A. (s.d.). *METODI IN METAGENOMICA PER L'ANALISI DEL MICROBIOMA: APPLICAZIONE A PAZIENTI AFFETTI DA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICO OSTRUTTIVA E DA CANCRO AL COLON*.
8. Zhen Zhang, J. Y. (2019). Compositional and Functional Analysis of the Microbiome in Tissue and Saliva of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2019.01439

