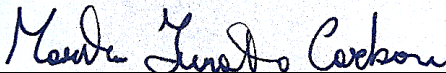


## PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT

Cognome/Surname	Iurato Carbone
Nome / Name	Martina
Titolo del progetto / Project title	Valutazione del microbiota orale in lesioni potenzialmente maligne e cancro orale
Corso di dottorato / PhD	Oncologia e Chirurgia sperimentali
Firma del candidato/ Applicant's signature	

### 1 - Sommario / Abstract

Attualmente il cancro è la seconda causa di morte nel mondo e in Italia. A livello globale, il cancro del cavo orale è il 15° tumore maligno più comune<sup>1</sup>.

Il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) rappresenta circa l'85% dei tumori del cavo orale ed è la principale causa di morte tra questi, con oltre 350.000 nuove diagnosi e oltre 175.000 decessi registrati in tutto il mondo nel 2018<sup>2</sup>.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'OSCC sono il fumo di tabacco, il consumo eccessivo di bevande alcoliche, la masticazione del betel, la scarsa igiene orale e l'infezione da Papillomavirus (HPV). Tuttavia, circa il 15-20% di tutti i casi di cancro orale si verifica in pazienti che non presentano nessuno di questi fattori di rischio.

Altri importanti fattori di rischio includono processi infiammatori cronici nella cavità orale, virus e batteri, traumi cronici alla mucosa<sup>3</sup>.

Le lesioni potenzialmente maligne (PMD) sono lesioni della mucosa orale, principalmente leucoplachia, ma anche eritroleucoplachia, eritroplachia e leucoplachia verrucosa proliferativa (PVL), che precedono in modo imprevedibile lo sviluppo invasivo dell'OSCC. Sebbene siano stati citati tassi di trasformazione maligni variabili, una revisione sistematica ha stimato un rischio di cancro complessivo del 12% su un tempo di trasformazione medio di 4,3 anni<sup>4</sup>.

Sebbene il meccanismo patogeno del microbiota sia ancora poco chiaro, nel corso degli anni sono stati fatti grandi passi avanti.

Sono stati suggeriti tre meccanismi d'azione del microbiota orale nella patogenesi del Cancro:

1. Stimolazione batterica dell'infiammazione cronica:
2. Attività antiapoptotica:
3. Produzione di sostanze cancerogene<sup>5</sup>:

L'**idea** del progetto nasce dalla possibilità di poter approfondire la correlazione tra il microbiota presente in cavo orale e l'evoluzione e insorgenza del carcinoma, al fine di validare degli specifici indicatori di malignità o rischio di evoluzione maligna che permettano di migliorare la qualità di vita e prolungare la sopravvivenza.

Il coinvolgimento di microrganismi specifici nello sviluppo del cancro è stato studiato per oltre un secolo. Sono state dimostrate associazioni tra batteri e neoplasie umane, come l'*Helicobacter pylori* per il carcinoma gastrico, la *Chlamydia trachomatis* nel carcinoma della cervice, la *Salmonella typhi* nel cancro alla cistifellea e *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium nucleatum* nel carcinoma del colon-retto<sup>6</sup>.

Negli ultimi due decenni, è stata valutata l'associazione di specifici microrganismi nello sviluppo di OSCC e PMD mediante tecniche convenzionali.

Dalla review realizzata nel 2018 dalla World Workshop on Oral Medicine VII<sup>7</sup>:

- Studi su colture registrano una maggiore presenza dei generi *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Veillonella* in OSCC rispetto a mucosa sana<sup>8</sup>
- Studi molecolari su specie batteriche selezionate suggeriscono associazioni con OSCC di *Streptococcus anginosus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis* e *Porphyromonas gingivalis*<sup>9</sup>.
- Studi che utilizzano ibridazione DNA-DNA e PCR hanno suggerito il coinvolgimento di *Candida albicans* nel cancro orale e *Streptococcus*, *Fusobacterium* e *Capnocytophaga* nel lichen planus orale<sup>10</sup>.

## 2 - Descrizione del progetto / Project

### Obiettivo primario del progetto di ricerca

- Valutare, mediante analisi microbiologiche su saliva, le caratteristiche qualitative e quantitative del microbiota presente in PMD e OSCC
- Confrontare le variazioni del microbiota rispetto al gruppo controllo
- Ricerare uno o più possibili indicatori di neoplasia in pazienti a rischio e non

### Obiettivi secondari del progetto di ricerca

Eseguire una revisione sistematica della letteratura riguardante le correlazioni tra microbiota orale e insorgenza di OSCC e PMD.

### Obiettivi opzionali

- Analizzare il microbiota orale in pazienti sottoposti a radio/chemioterapia con reazioni avverse (e.g. mucosite).
- Valutare la modifica del microbiota in pazienti con PMD mediante dieta, uso di collutori o altro.
- Valutare altri metodi di campionamento per il microbiota.

### Disegno dello studio

Il presente studio sarà di tipo sperimentale, caso-controllo, con due gruppi test, formati da pazienti con PMD (A) e pazienti con OSCC (B) e un gruppo Controllo (C) formato da pazienti sani.

### Arruolamento e Campionamento

Le fasi di arruolamento e campionamento verranno eseguite presso il Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche Stomatologiche (DiChirOnS) e presso l'ambulatorio di Medicina Orale dell'AOUP "Paolo Giaccone" di Palermo.

Le fasi di laboratorio prevedono l'utilizzo delle apparecchiature dell'A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo.

I pazienti saranno divisi in 3 gruppi: lesioni potenzialmente maligne (B), Carcinoma squamoso del cavo orale (B) e gruppo controllo (C).

L'arruolamento dei pazienti seguirà i criteri di inclusione ed esclusione presentati nella tabella 1.

Criteri di Inclusione	Criteri di esclusione
Età maggiore di 18 anni	Attualmente in gravidanza o allattamento
Assenza di sospetto o evidente stato di gravidanza	Terapia antibiotica negli ultimi 3 mesi

Diagnosi clinica di PMD per il gruppo A	Chemioterapia o radioterapia nell'ultimo mese
Diagnosi clinica di OSCC per il gruppo B	HIV positivo
Pazienti sani nel gruppo controllo C	Lesioni aftose o ulcere per soggetti del gruppo A

Tabella 1: Criteri di inclusione ed esclusione

## Metodi

Il progetto di ricerca verrà diviso in 4 work packages, integrati funzionalmente e cronologicamente. I working packages a loro volta saranno suddivisi in una o più task da eseguire.

### Work Package 1: Coordinamento del progetto e continuo aggiornamento della letteratura

- WP1/Task1: Coordinamento del progetto di ricerca attraverso la redazione di diario giornaliero.
- WP1/Task2: Ricerca elettronica degli articoli scientifici effettuata tramite il database di Pubmed, con le parole chiave: *oral squamous cell carcinoma, potentially malignant disorder, PMD, OPMD, OSCC, microbiota, leukoplakia, erythroleukoplakia, erythroplakia, proliferative verrucous leukoplakia, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Streptococcus sp., Peptostreptococcus sp., Prevotella sp., Capnocytophaga gingivalis.*

### Work Package 2: Reclutamento pazienti, campionamento

- Wp2/Task 1– Fase di reclutamento pazienti  
I pazienti saranno reclutati consecutivamente presso il Dipartimento di DiChirOnS e presso il reparto di Medicina Orale dell'AOUP "Paolo Giaccone" Palermo.
- WP2/Task 2 – Fase di campionamento.  
I pazienti del gruppo A e B andranno incontro a campionamento salivare e biopsia incisionale per conferma del sospetto diagnostico clinico (PMD o OSCC).  
I pazienti del gruppo Controllo andranno incontro solo a campionamento salivare.
- WP2/Task 3 – Fase di analisi  
I campioni prelevati verranno analizzati presso l'A.O.U.P. "Paolo Giaccone" di Palermo.

### Work Package 3: Follow up

- Valutazione di eventuali modifiche dopo terapia chirurgica o complicanze (Gruppo A)
- Prevenzione trasformazione ed eventuale 2° campionamento (Gruppo A)

### Work Package 4: Analisi statistica dati

- WP3/Task1: Analisi dei dati raccolti di WP2 e WP3
- WP3/Task2: Confronto dei risultati ottenuti nei WP2 e WP3 con dati presenti in letteratura (WP1).

## Punti di verifica

Durante i 36 mesi del progetto di ricerca si valuteranno i progressi della ricerca attraverso punti di verifica (tabella 4) suddivisi nei sei semestri.

<b>Fasi progetto di ricerca</b>	<b>di</b>	<b>Work package</b>	<b>Punti di verifica</b>
Fine semestre	I	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Reclutamento pazienti gruppo A, B e C</li> <li>• Fase di campionamento</li> <li>• Analisi laboratorio tamponi salivari e campioni bioptici</li> </ul>
Fine semestre	II	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Reclutamento pazienti gruppo A, B e C</li> <li>• Fase di campionamento</li> <li>• Analisi laboratorio tamponi salivari e campioni bioptici</li> </ul>
Fine semestre	III	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Reclutamento pazienti gruppo A, B e C</li> <li>• Fase di campionamento</li> <li>• Analisi laboratorio tamponi salivari e campioni bioptici</li> </ul>
Fine semestre	IV	WP1, WP2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Fase di campionamento</li> <li>• Analisi laboratorio tamponi salivari e campioni bioptici</li> <li>• Possibile ampliamento sperimentazione</li> <li>• Ipotesi sviluppo obiettivi opzionali</li> </ul>
Fine semestre	V	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Fase di campionamento</li> <li>• Analisi laboratorio tamponi salivari e campioni bioptici</li> <li>• Possibile ampliamento sperimentazione</li> <li>• Ipotesi sviluppo obiettivi opzionali</li> </ul>
Fine semestre	VI	WP1, WP2, WP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controllo procedure e coordinamento da parte del tutor</li> <li>• Revisione sistematica dati presenti in letteratura su PMD e OSCC</li> <li>• Sottomissione di articoli scientifici</li> </ul>

Tabella 2: Punti di verifica

## Risultati attesi

	<b>Risultati attesi</b>
<b>Work Package 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coordinamento del progetto di ricerca attraverso la redazione di diario giornaliero</li> <li>• Revisione sistematica della letteratura sulle variazioni del microbiota orale in pazienti con PMD e OSCC</li> </ul>
<b>Work Package 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reclutamento di 60 pazienti per il gruppo A e altrettanti pazienti per i gruppi B e C</li> <li>• Rilevazione di specie microbiche presenti nel gruppo A e/o B e assenti in C e viceversa</li> <li>• Analisi microbiologiche e immuno-istochimiche sui campioni prelevati</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esecuzione di foto cliniche di ogni singola lesione studiata</li> </ul>
<b>Work Package 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valutazione delle caratteristiche cliniche ed eventuali modifiche nel gruppo A</li> <li>• Prevenzione e trasformazione di PMD</li> <li>• Esecuzione di foto cliniche di ogni singola lesione studiata</li> </ul>
<b>Work Package 4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analisi dei dati raccolti (WP2 e WP3) e confronto con la revisione sistematica della letteratura eseguita (WP1)</li> <li>• Validazione di indicatori di malignità o di rischio di evoluzione maligna</li> </ul>

Tabella 3: Risultati attesi dal progetto di ricerca

### Ricadute

La collaborazione di competenze scientifiche diverse porterà non solo ad unire la loro esperienza professionale, ma anche alla possibilità di valutare i dati raccolti attraverso differenti interpretazioni interdisciplinari e considerare i possibili modi per implementare la ricerca.

Ci si aspetta di avere la dimostrazione scientifica che vi siano associazioni tra batteri e cancro orale, in modo da fornire una prognosi migliore grazie alla diagnosi precoce e alla gestione efficace delle lesioni potenzialmente maligne.

### Prodotti del progetto di ricerca

Al termine del progetto si effettuerà la divulgazione dei dati attraverso la presentazione a congressi nazionali ed internazionali dei risultati della ricerca e la pubblicazione di articoli su riviste di rilevanza nazionale e internazionale.

### 3 - Bibliografia / References

1. Cancer. Available online [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_3) (accessed on 18 July 2020).
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68, 394–424. [CrossRef] [PubMed]
3. Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: A brief approach. *Braz Dent J* 2012;23:586-90
4. Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow -up of oral dysplasia – a systematic review and meta -analysis. *Head & Neck* 2009 31 : 1600 - 1609.
5. Karpiński TM. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms*. 2019;7(1):20. Published 2019 Jan 13. doi:10.3390/microorganisms7010020
6. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med.* 2005; 3: 27.
7. Robledo-Sierra J, Ben-Amy DP, Varoni E, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders. *Oral Dis.* 2019;25 Suppl 1:28-48. doi:10.1111/odi.13107
8. Hooper, S. J., Crean, S. J., Lewis, M. A., Spratt, D. A., Wade, W. G. & Wilson, M. J. (2006). Viable bacteria present within oral squamous cell carcinoma tissue. *J Clin Microbiol* 44, 1719–1725.
9. Khajuria N, Metgud R. Role of bacteria in oral carcinogenesis. *Indian J Dent.* 2015;6(1):37-43. doi:10.4103/0975-962X.151709
10. Amer A, Galvin S, Healy CM, Moran GP. The Microbiome of Potentially Malignant Oral Leukoplakia Exhibits Enrichment for *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, and *Rothia* Species. *Front Microbiol.* 2017;8:2391. Published 2017 Dec 1. doi:10.3389/fmicb.2017.02391