ISSN 2038-4793

Frontiera ORL

Periodico di Otorinolaringologia, Patologia Cervico Facciale, Audiologia e Foniatria

Periodic of otolaryngology, cervico-facial pathology, audiology and speech therapy



ebook

UN NUOVO METODO DI STUDIO PER L'ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO NEL CANCRO ORALE E LARINGEO

Roberto Menicagli · Ortensio Marotta

www.frontieraorl.it

UN NUOVO METODO DI STUDIO PER L'ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO NEL CANCRO ORALE E LARINGEO

MENICAGLI ROBERTO *

MAROTTA ORTENSIO **

*GENETIC –BIOCHEMISTRY SENIOR RESEARCHER

** DIRECTOR of U.O.C. E.N.T SANT'ANNA HOSPITAL -CASERTA

1-SOMMARIO

2-FISIOPATOLOGIA DEL CAVO ORALE

3- FISIOPATOLOGIA DELLA LARINGE

4- EVIDENZE GENETICHE NEL CANCRO DEL CAVO ORALE E DELLA LARINGE

5- UN NUOVO APPROCCIO NELL'EZIOLOGIA DEL CANCRO ORALE E LARINGEO

6- LE MUCINE COSTITUENTI LO STRATO PROTETTIVO

7_LE ALTERAZIONI DELLO STRATO PROTETTIVO:I PRINCIPALI FATTORI DÌ RISCHIO

7-1--HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV)

7-2-FUMO, ETA' E CANCRO

7-3- STILI DÌ VITA ,ALIMENTAZIONE –FARMACI, PATOLOGIE-

7-3- 1-BETEL

7-3-2- GREEN TEA

7-3-3- PAPRIKA

7-4 –FARMACI:CORTICOSTEROIDI E FANS

7-5-PATOLOGIE

7-5-1- REFLUSSO ESOFAGEO

7-5-2- DIABETE

7-6 - SESSO

8 – INDICATIONI – PROSPETTIVE–CONCLUSIONI

1-SOMMARIO

L'etiologia dei tumori orali e laringe è molto complessa; Mutazioni genetiche, promosse da vari fattori di rischio, soprattutto fumo e infezione da HPV, sono considerate la causa principale. L'ipotesi sottostante a questo studio ritiene che possano verificarsi delle mutazioni del gene dopo che lo strato mucoso che protegge l'epitelio di tutta la cavità orale e la laringe è stato alterato da questi fattori di rischio e diventa loro permeabile. Ruolo dominante mucine epiteliali, o quelle secreto nella saliva, che può essere la prima ad essere alterata, da un certo numero di fattori interni e / o esterni. Molti fattori possono influenzare lo strato mucoso protettivo orale e laringeo, nelle loro componenti principali secreto nella saliva, MUC7, MUC5B, o alterare le mucine aderenti all'epitelio (MUC1). Ad esempio, il fumo, l'alcool, i processi infiammatori, producendo grandi quantità di radicali liberi, possono alterare l'equilibrio delle mucine, e lo stesso equilibrio , può essere modificato, dai processi di invecchiamento, per un inefficace controllo metabolico . Composti chimici presenti negli alimenti, come i polifenoli o alcuni farmaci, come gli steroidi ed i FANS , possono infine interagire con le mucine, precipitandole. Condizioni psico-endocrinologiche particolari (condizioni post e pre-menopausuali) e altri disturbi ormonali , possono influenzare le difese orali,diminuendo l'espressione genica di MUC1 epiteliale nella mucosa orale, mentre le malattie come diabete sono invece responsabili di una iper produzione delle mucine secrete,provocando anch’esse alterazioni del suddetto strato. Tutti questi processi, favoriscono ad esempio, l’infezione da HPV, che peraltro ha così, la più alta incidenza, solo nel sito

anatomico, in cui lo strato di mucina è in sostanza assente, in altre parole nelle tonsille. Quindi molti fattori possono causare, modifiche delle due frazioni delle mucine salivari , principalmente di quelle secrete, che sono i costituenti principali dello strato mucoso che protegge la cavità orale e la laringe,così che ogni variazione provoca, un'alterazione delle sue caratteristiche reologiche, valutate sperimentalmente, con la modifica dello spinnbarkeit. Lo spinnbarkeit, riflette, infatti, la capacità della saliva di aderire alle superfici all'interno della bocca, quindi serve come indice del suo ruolo protettivo, nel processo di adesione e nella lubrificazione: la sua modifica, indica l'alterazione di questo layer , che è normalmente chiaro, trasparente , elastico e scivoloso , in rapporto all'epitelio boccale. Le alterazioni dei valori di, in alto o in basso, rispetto a un range di normalità, dello spinnbarkeit della saliva possono causare la perdita di adesività o la capacità di legare, virus o composti chimici cancerogeni.

2-FISIOPATOLOGIA DELLA CAVITÀ ORALE:

- Masticazione

- digestione (enzimi salivari)

- Parlare (laringe, lingua, guance, labbra)

- Gustativa (chemoreception)

- Swallowing, in altre parole deglutizione (palato duro e morbido)

Il cancro della bocca (orale) è un'importante neoplasia, diffusa in tutto il mondo e rappresenta la maggior parte dei tumori della testa e del collo. Teoricamente dovrebbe essere in gran parte prevenibile o rilevabile in una fase precoce. Circa il 90% dei tumori orali è il carcinoma a cellule squamose (SCC), che è visibile tipicamente sulla parte laterale o laterale della lingua, di solito come grumo o ulcera bianca, rossa o mista di bianco e rosso. La SCC è particolarmente comune nel mondo in via di sviluppo, soprattutto nei maschi più anziani. C'è preoccupazione per un aumento continuo nei pazienti più giovani e nelle donne, così come per quello orofaringeo. L'etiologia dello SCC sembra essere multifattoriale e molto correlata all'infezione da HPV e dal tabacco, da solo o con la masticazione del betel e, meno influenzato da stili di vita, abitudini , dieta, o dall'uso di alcool. Altri fattori come traumi ripetuti, possono coinvolgere, le gengive e il palato, mentre alcuni difetti immunitari o la soppressione immunitaria, alterazioni del metabolismo, o difetti negli enzimi di riparazione del DNA sono alla base di alcuni casi di SCC;anche l'esposizione alla luce del sole predispone al cancro delle labbra.

3- FISIOPATOLOGIA DELLA LARINGE

La laringe è un organo essenziale che è responsabile delle seguenti funzioni vitali:

• Mantenere una corretta areazione

Modulazione della voce

• Proteggere i polmoni dall'esposizione diretta a fumi nocivi e gas di temperature non adatte

• Proteggere i polmoni dall'aspirazione di solidi e liquidi

• Permette, chiudendo la glottide, la manovra di Valsalva,

I tumori maligni della laringe possono influenzare la fisiologia laringea secondo la posizione e delle dimensioni del tumore. I tumori sopraglottici non possono alterare il modo di funzionare laringea fino a che non raggiunge una dimensione relativamente grande, momento in cui l'ostruzione delle vie aeree può essere il primo sintomo. Al contrario, i tumori glottici alterano la qualità della voce all'inizio del loro sviluppo e sono spesso scoperti in una fase precoce. Inoltre, i tumori maligni della laringe influenzano la fisiologia della deglutizione. Il meccanismo di deglutizione è alterato quando i tumori invadono e alterano la fisiologia dei muscoli di deglutizione, e questo può portare a disfagia o a difetti di aspirazione. Lo sviluppo e la progressione dei tumori maligni della laringe avvengono a livello molecolare e istologico. I passi molecolari coinvolti nella cancerogenesi non sono stati completamente chiariti e probabilmente variano da paziente a paziente. La progressione istologica avviene dalla normale mucosa laringea alla mucosa displastica,fino al carcinoma in situ ,per divenire poi carcinoma invasivo. Questa progressione è un processo multi-step di eventi genetici accumulati che portano allo sviluppo di tumori laringeali. Fino a quando non si possono capire le complesse interazioni molecolari di tutti gli agenti etiologici associati a qualsiasi cancro, queste interazioni sono solo spiegabili appunti come eventi concatenati. Pensare a fattori intrinseci (a es. Genetici) e / o estrinseci (ad esempio, fumo) come le sole cause sono troppo semplici. Per la maggior parte delle persone, una causa implica una condizione

necessaria e sufficiente per produrre un risultato preciso. I potenziali fattori di rischio legati allo sviluppo del cancro laringeo includono:

• uso del tabacco e alcol

• Sesso maschile

• Infezione con papilloma virus umano

• Maggiore età

• Esposizione ai gas fumi diesel e benzina.

• Esposizione alle radiazioni

• Riflusso gastroesofageo

Cancri che iniziano dal tessuto epiteliale, (tumore delle cellule squamose), rappresentano circa novanta casi su ogni 100 tumori laringeali. Il cancro si sviluppa, come cellule squamose che coprono la superficie dell'epiglottide, delle corde vocali e di altre parti della laringe. I tumori maligni della laringe possono influenzare la fisiologia laringea secondo la posizione e delle dimensioni del tumore

4- EVIDENZE GENETICHE NEL CANCRO DEL CAVO ORALE E DELLA LARINGE

. La ricerca genetica, indipendentemente dai diversi fattori di rischio evidenziati sopra, cerca di scoprire quali sono i geni, da cui parte del segnale biochimico che trasforma una cellula normale cancerosa. La mutazione di alcuni geni genera generalmente una alterazione dei recettori di membrana , che agiranno come "interruttore chimico nella posizione ON. Il risultato è un meccanismo incontrollato di duplicazione del DNA, e

l'identificazione di questi geni, può portare alla scoperta della chiave per spegnere il meccanismo di questo processo di proliferazione cellulare incontrollata. La nostra recente rassegna (1) con una ricerca in Pub Med e GENE, dal 2000, fino al 2016, usando come chiave di ricerca "mutazione genetica nel cancro orale e mutazione genetica nel cancro laringeo" E il cancro laringe, rispettivamente, 2020 e 364 articoli, che mostra tutti gli studi condotti per l'identificazione dei geni presumibilmente coinvolti nella formazione di questi tipi di cancro. Questo nostro studio, basato, sull'analisi bibliografica ha avuto lo scopo di fare una revisione critica,sui meccanismi per i quali l'alterazione genetica, influenza, la promozione del cancro orale e laringeo :sono stati analizzati, per tutti i geni possibili, solo i riferimenti che presentano una validità scientifica e non articoli citati singolarmente, o anche con un pochi riferimenti, In una prima selezione in PUBMED e GENE, sono stati identificati 22 geni, potenzialmente correlati con lo sviluppo di cancro orale e laringeo; Questo indice di geni, con presunta "influenza genetica", è stato inserito nella banca dati "Genetic Home References" che mostra, in termini SCIENTIFICAMENTE CONFIRMATI, le funzioni cellulari e gli effetti delle loro mutazioni in tutti gli organi in termini di promozione Carcinogenesi) ;in questo modo , questo numero è stato ridotto a quattordici geni (vedi tabella 1). Il nostro studio ha identificato questi quattordici geni, come sicuramente coinvolti nel processo di carcinogenesi e ha un valido riscontro con un’omologa recensione recentemente pubblicata da Nature, nel 2016, (due). Questa review, ha analizzato la relazione tra le variabili più frequentemente incontrate, nei tumori della cavità orale e della laringe, con la frequenza e il tipo di mutazioni di diversi geni

(missense, framshift, ecc.), con Il fumo, e il livello d'infezione HPV, il tutto a proposito dei vari siti anatomici. Il risultato di quest'analisi dettagliata indica che i geni coinvolti nella più alta percentuale di casi sono Tp53 e CDKN2A, (1), con il tipo di mutazioni missense e che esiste necessariamente un loro coinvolgimento, con la presenza simultanea dello stato di fumo e l'infezione da HPV. Entrambi i geni sono oncogeni soppressori, e sono presenti, dopo l'analisi istologica, in circa l'80%-90 %, dei casi dei tumori del collo e del capo. Le loro mutazioni, tuttavia, sono implicati nell'insorgenza di vari altri tumori, come quelli della vescica, del seno e del melanoma. Questo risultato ,deriva dal fatto che il loro ruolo principale è quello di fermare il processo cellulare degenerativo, con altri geni che generalmente agiscono in cascata, ma sempre dopo che la mutazione genetica è presente su entrambi gli alleli. È dunque chiaro, vista la particolare predisposizione familiare ricorrente, di soffrire di certi tipi di cancro, che la probabilità di ereditare uno di questi geni mutati, in un solo allele, predispone ,in una certa maniera al rischio di carcinogenesi, ma solo per la perdita di Omozigosità, (eterozigote per l' allele sano). Solo dopo la perdita di eterozigosità (-LOH: perdita di eterozigosità), il gene, ad esempio T p53, perde completamente la sua espressione genetica che controlla il ciclo cellulare nel ruolo chiave della capacità di ricostituzione e riparazione cellulare. Possiamo quindi affermare che, questo sviluppo del cancro, per la cavità orale e la laringe, è innescato sicuramente da mutazioni geniche derivanti però,da cause endogene e / o esogene, che recenti ricerche hanno identificato soprattutto nel fumo, nell'abuso di alcol e nei casi di infezione da HPV. Entrambi i geni, sono presenti,come possiamo vedere in tabella 1,in tante situazioni patologich

TABLE 1. Results in the questions on genetic influence in oral and laryngeal cancer formation. by genetic home references

gene	coded protein and functions	diseases and pathology
tp53 17p13.1	p53-tumor suppressor	breast,bladder,neck head squamous cancer and others cancers,li fraumen syndrome
tp63 3q21	p63-transcription factor	amylo-blepharonectodermal defect ,neck head cancer
cdkn2a 9q21	p16-p14-tumor suppressor	neck head squamous cancer, melanoma ,breast pancreatic cancer
notch1 9q34.3	notch1-receptor for proliferation, differentiation, apoptosis	adam-oliver syndrom,neck head cancer
pik3ca 3q26.3	p110α-oxidative phosphorylation, cell division signal	megaloencephatie capillary,malformation ,colorectal cancer
hras 11p15.5	hras-oncogenic and cell division	costello syndrome, bladder, thyroid, kidney cancer
sat1 xp22.2	acetyltransferase family of polyamides metabolism, detoxification	keratosis deculvans
caspe 2p33-34	family caspse /protease-, apoptosis	autoimmune lymphoproliferative syndrome, breast neck head and lung cancer
fat1 4q35	tumor suppressor-catherins family-cells adesion	many cancers
hla/abc 6p21.3	human leucocytes antigen-mhc	autoimmune diseases
cyp101 2p22.2	p 450 cytochrome family - metabolism of detoxification	early –nonset,glaucoma ,peters anomaly
xrcc3 14q32.3	reca/ rad 51-stability of chromosomes, dna repair	breast ,melanoma,head and neck many cancer
adh 4q23	alcohol deydrogenase - energy metabolism and sugar control	alcohol dependence, diabetes
not212 22q12.1	nuclear erytroid derived/transcription factor with up-regulation of oxidative stress	diabetes, multi-sclerosis

5- Un nuovo approccio, nell'eziologia del cancro orale e della laringe

Questo nuovo approccio, tende a definire come l'attuale insorgenza dei tumori del capo distrettuale e del collo, non è causato,solo da fattori ereditari, con l'aiuto del fumo, dell'alcool e della presenza di HPV. Questa ipotesi è infatti in relazione con i dati epidemiologici (3), che mostrano, (vedere la tabella 2), come ad esempio nei principali paesi in cui il cancro laringeo ha il più alto indice (ASR), come Cuba e Iraq, non c'è, assolutamente un elevato consumo di alcool e tabacco Le stesse conclusioni possono essere consentite per i dati epidemiologici relativi all'incidenza del cancro orale in presenza di tabacco e uso di alcool, (4) , (5); vedere la tabella 3

Table 2 laryngeal cancer epidemiology ASR index in correlation with smoking and alcohol habits

CUBA	7,6	+	+
HUNGARIA	6,4	++	+++
IRAQ	5,6	+	-
KAZAKISTAN	5,5	++	++
UZBEKISTAN	5,5	++	++
MOLDAVIA	5,3	++	+++
ROMANIA	5,0	++	+++
MONTENEGRO	5,0	++	+++
BULGARIA	4,9	++	+
CROAZIA	4,7	++	+++
SIRIA	4,6	+	+
PORTUGAL	4,6	++	+++
TURKMENISTAN	4,5	+	++
VENEZUELA	4,4	+	+
POLONIA	4,3	++	++
ITALY	3,2	++	++

Duca - Mannicaqui

Legend: ASR index = age standardization rate ;numero di casi / 100000 peoples

+ Normal –moderate habits; ++ high ;+++ excessive

Table 3 Cancer epidemiology; ASR index of oral cancer in correlation with smoking and alcohol habit

COUNTRY	ASR	SMOKING	ALCOHOL
PAPUA NEW GUINEA	25,4	+	+
MALDIVE	11,0	-	-
SHRY LANKA	10,3	+	-
BANGLADESH	10,1	+	-
PAKISTAN	9,9	+	-
UNGHERIA	9,7	++	+++
INDIA	7,6	+	+
PORTOGALLO	6,8	++	+++
SLOVACCHIA	6,5	+	++
AUSTRALIA	6,3	+	+
KAZAKISTAN	6,3	++	++
MYANMAR	6,3	+	+
AZERBAIJAN	6,3	++	++
AFGANISTAN	6,3	++	.
KAMBOGIA	6,0	+	+
ITALIA	3,06		+

22

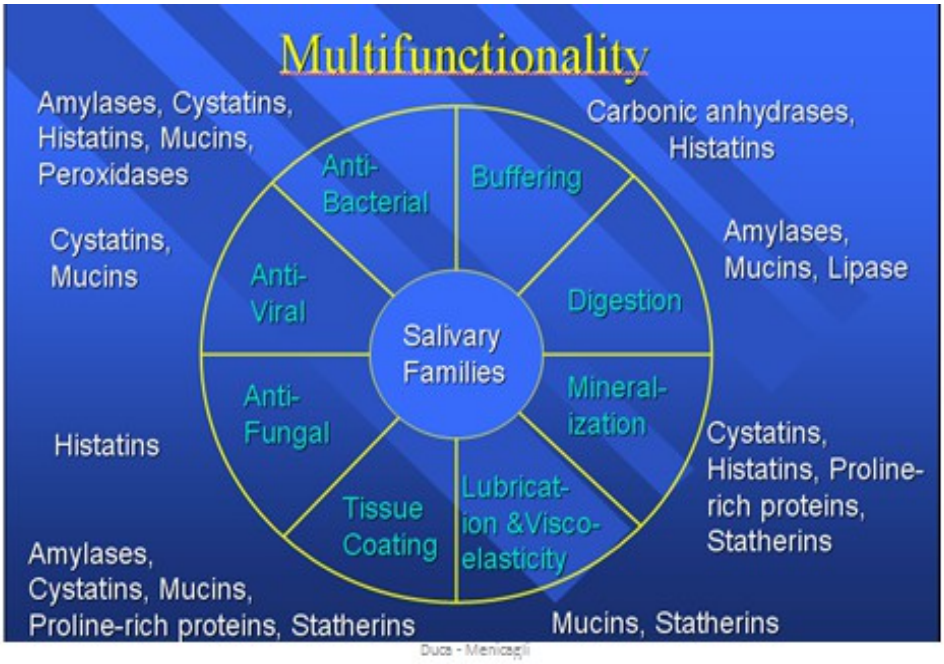
I dati sopra indicati indicano chiaramente che potrebbero esserci altre cause nella promozione del cancro e che comportino mutazioni che alterino entrambi gli alleli dello stesso gene. Queste cause possono essere presenti in molti fattori di rischio, come il tabacco, l'HPV, l'alcool, l'età, il sesso,l'uso di farmaci ,abitudini alimentari, e in alcune malattie, come il diabete. La ricerca nel campo della cancro orale e della laringe ,deve studiare i meccanismi con cui determinati fattori biochimici e fisici alterano quella struttura di difesa cellulare ,orale e laringea ,costituita principalmente dalle mucine salivari (6). Anche se il cancro laringeo in alcuni aspetti è diverso da quello della cavità orale, bisogna ricordare che lo strato di mucinico protegge anche questa struttura anatomica e pertanto è prevedibile che i processi delle sue alterazioni abbiano in ogni caso una stessa origine . Lo

scopo di questo studio, parte dall'ipotesi che ogni fattore di rischio possa causare alterazioni nella cavità orale e nella laringe, con modifiche estremamente importanti e irreversibili nello strato di mucina salivare, e consente, ad esempio il fumo e l'HPV di mutare i geni . Altri fattori di rischio, possono influenzare irreversibilmente la normale struttura genetica della cellula, consentendo , la possibilità ai fattori di rischio, di agire sul metabolismo cellulare senza trovare una barriera protettiva adeguata

6-Lo Strato Protettivo Delle Mucine

Il muco orale, con le sue componenti proteiche, forma un rivestimento protettivo su superfici epiteliali umide in tutto il corpo che ospita il micro biota e svolge un ruolo chiave nella difesa ospitante. Le mucine,sono le componenti strutturali primarie del muco che creano le sue proprietà visco -elastiche, ed hanno un ruolo chiave nella formazione delle fasi gel e non gel ,che proteggono dagli agenti patogeni invasivi. Alterazione della produzione di mucina, sono implicate nelle malattie anche in altri siti anatomici ,oltre che la cavità orale e la laringea, come nella colite ulcerosa, l'asma e la fibrosi cistica, evidenziando l'importanza delle mucine nel mantenere l'omeostasi, nelle difese di molti organi del corpo umano (vedere la figura 1)

Figura 1 Multifunzionalità dei component salivari



6-1-Mucine nella cavità orale

Le mucine salivari più importanti sono MUC5B, MUC7 e MUC1: sono costituite da una struttura di dominio univoco (7), che influenza le loro proprietà fisiche, ed anche la localizzazione nella cavità orale. MUC5B è la principale mucina formante lo fase gel ,sull'epitelio boccale, e viene secreta dalle cellule mucose nelle ghiandole salivari submandibolari, sublinguali, palatine e labiale. Sono stati identificati, altre mucine di tipo trascrizionale, glicoproteine come MUC19, mucina salivare che forma gel, ma a MUC5B è considerata quella predominante nella formazione del gel nella cavità orale. MUC7 è anch'essa una mucina di tipo secretorio , che esiste principalmente come monomero o dimero , e manca di proprietà di gel-forming. Questi monomeri e dimeri sono in grado di auto-associarsi, a

formare gruppi di ordine superiore; la localizzazione MUC7 all'interno delle ghiandole salivari varia negli individui ,ed stato identificato nelle cellule mucose delle ghiandole sub-mandibolari e sublinguali, ma la presenza di MUC7 nelle cellule sierose di queste ghiandole è variabile. MUC1 è una mucina membrana associata, cioè una mucina che allinea i condotti delle ghiandole salivari parotide, sub mandibolari e minori e che può svolgere un ruolo nella trasduzione del segnale cellulare.

6-2-Struttura dello strato mucinico salivare e meccanismo secretorio .

MUC7 e MUC5B hanno diversi aspetti nelle loro sequenze primarie che determinano la loro capacità di formare gel e strutture di ordine più elevato, condividendo anche molteplici funzioni. Sia MUC7 che MUC5B sono costituiti da una spina dorsale di proteine con catene di glucidi che irradiano verso l'esterno per formare una "spazzola": vedi figura 2 e fig 3

FIGURA 2 - STRUTTURA MOMOMERICA DELLE MUCINE

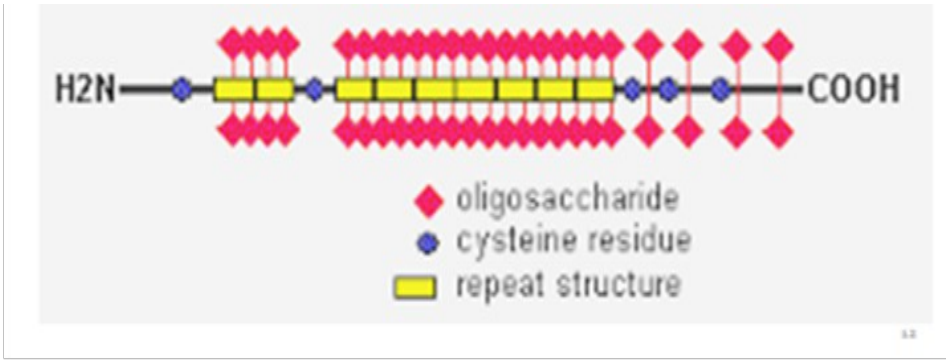
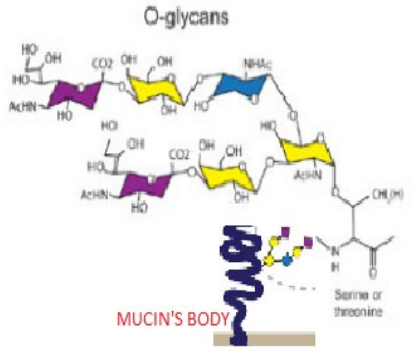
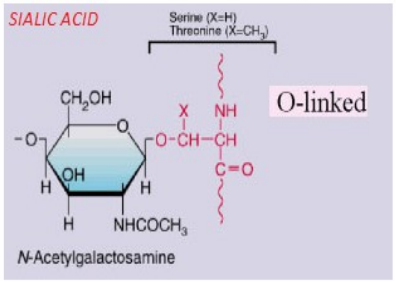
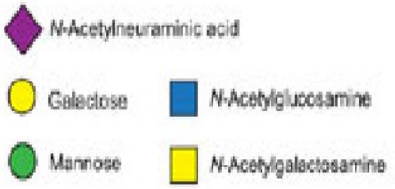
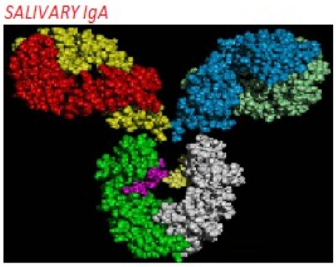


FIGURA 3 La Parte Glicosilata delle Mucine









La spina dorsale,(back-bone),di MUC5B è composta da circa 5.700 aminoacidi ed è ampiamente organizzata nella regione N-terminale, glicosilata centrale e C-terminale. La regione glicosilata centrale di MUC5B contiene unità ripetute di 29 aminoacidi ricchi di serina e treonina ,importanti,come vedremo successivamente, nel processo del legame con composti chimici come i polifenoli. Il dominio C-terminale partecipa alla formazione di legame di disolfuro, che collega i singoli monomer,i MUC5B, a dimeri e poi a catene polimeriche,attraverso la formazione di legami di disolfuro al N-terminale. Dopo la secrezione del granulo di mucina , gli ioni di calcio bivalente, che stabilizzano il polimero di mucina piegato all'interno del granulo secretivo, vengono scambiati con ioni di sodio monovalenti. L'aumento della pressione osmotica porta ad un processo di idratazione, che guida l'espansione dei polimeri e

la formazione di un gel (8). I polimeri espansi cross- linkano fra di loro attraverso catene polimeriche di glicoproteine e / o legami non covalenti formati da interazioni idrofobiche (9). Il calcio può anche mediare la reticolazione di MUC5B per formare strutture di ordine più elevato. MUC7 ,ha un backbone di 357-aminoacido con una regione centrale di unità ripetute composta da 23 aminoacidi ,e manca di un dominio ricco di cisteina terminale; pertanto, le mucine MUC7 non sono in grado di formare polimeri e esistono principalmente come monomeri. Le differenze nella struttura MUC7 e MUC5B e nella loro posizione fisica nella cavità orale influenzano i modi in cui forniscono protezione,al cavo orale e alla laringe

6-3. La pellicola associata alla mucosa

La mucosa orale deve essere estremamente dura da resistere alle condizioni estreme in cui è esposta, come l'azione abrasiva da parte di alimenti, variazione della temperatura,etc; ciò riguarda sia la dieta umana moderna quanto quella preistorica; Da bevande calde e da carne cotta a fuoco, fino a gelati o dessert congelati, erbe e verdure dure (compresi vari tuberi) che contengono particelle silicee altamente abrasive . La cavità orale ha due linee di difesa: in primo luogo, le parti della mucosa orale che sono sotto azione diretta di forze meccaniche come il palato duro si sono sviluppate in tessuti cheratinizzati meccanicamente più duri, progettati per proteggere le cellule sottostanti da danni. In secondo luogo, l'ambiente meccanico duro della cavità orale è protetto dall'effetto lubrificante della pellicola saliva che protegge sia lo smalto del dente che i tessuti molli, tra cui le superfici orali più morbide non-cheratinizzate come ad esempio

la mucosa buccale. La pellicola mucosa ,è un film sovra-molecolare con un'architettura complessa (10) che comprende diversi strati strutturali. Comprende un complesso di molte proteine salivari, tra cui: sIgA, MUC5B, MUC7, anidride carbonica VI (CAVI) e cistatina S. Le mucine salivare, MUC5B e MUC7 sono fondamentali per la protezione e la lubrificazione del livello a causa del loro elevato peso molecolare e lì elevato livello di idratazione dovuto alla presenza di regioni altamente glicosilate. Entrambi i tipi di mucine salivari si trovano fortemente conservati sulle superfici delle cellule buccali, mentre all'interno della pellicola aderente alla superficie smaltata dei denti ,la frazione dominante è MUC5B. Il processo di auto-assemblaggio delle proteine salivari varia notevolmente a seconda del tipo di superficie orale, con variazioni di composizione, contenuto proteico, spessore e velocità di ricostituzione. L'elemento chiave del processo di assemblaggio è la formazione di uno strato strettamente legato all'epitelio, che assicura l'adesione della pellicola e agisce anche come un modello per ulteriori associazioni proteina / mucina.

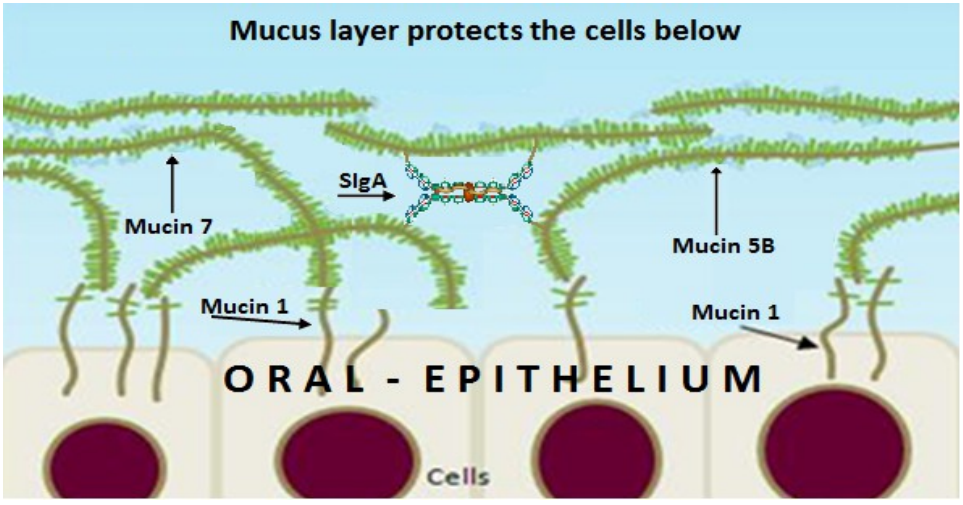
6.4 Formazione della pellicola mucosa legata e sua proprietà

L'adsorbimento di singole proteine salivari e della saliva intera è stato ampiamente studiato su diverse superfici,al fine anche di comprendere il ruolo efficace delle mucine in questo processo, (11) .MUC5B contiene sia domini molto glicosilati idrofili sia domini idrofobi situati in aree non glicosilate, MUC5B è anche dimostrato di avere un adsorbimento più forte a superfici idrofobe, a differenza di altri composti idrofili, portando così ad una maggiore massa adsorbita e a tempi di desorbimento più lenti

(12). L'aggiunta di calcio è inoltre stata dimostrata facilitare la deposizione di MUC5B attraverso la promozione di legami anche con altre proteine. A differenza di MUC5B, MUC7 ha un peso molecolare molto più piccolo (250 kDa rispetto a oltre 2000 kDa per MUC5B) e comprende una singola regione glicosilata circondata da piccoli domini non glicosilati . A causa di una maggiore dimensione relativa dei domini glicosilati, MUC7 presenta livelli di idratazione molto più elevati che influenzano l'adsorbimento. Tuttavia, MUC7 ha un'elevata propensione all'autocondensazione ,o auto assemblaggio, che può contrastare la sua alta solubilità e aumentare l'incorporazione nella pellicola con formazione di complessi con proteine a peso molecolare minore come IgA (13). Il processo di assorbimento delle proteine salivari e Il legame con le superfici è complesso , a causa del numero di proteine presenti, della loro dimensione e concentrazione . Questo processo complesso è governato da un accordo finemente sintonizzato di forze elettrostatiche e idrofobiche, legami di idrogeno, così come specifiche interazioni di legame a ponti di idrogeno nonché fenomeni di cross-linking Molti fattori possono influenzare la formazione di pellicole salivari, ad esempio la composizione ionica può avere un'influenza significativa sullo sviluppo delle pellicole, attraverso un aumento / diminuzione di interazione elettrostatica e cross-linking di proteine, ma i fattori più importanti sono la struttura e le concentrazioni delle stesse Mucine La rappresentazione schematica di questo strato è riportata di seguito,(fig 4) ; questa interpretazione ha una buona conferma nell'immagine,(foto 1), a fluorescenza, (14), figura 5. È stato dimostrato che le proteine salivari dimostrano un'affinità molto più elevata alle superfici idrofobe: ciò è in linea con il fatto che la mucosa orale nuda è

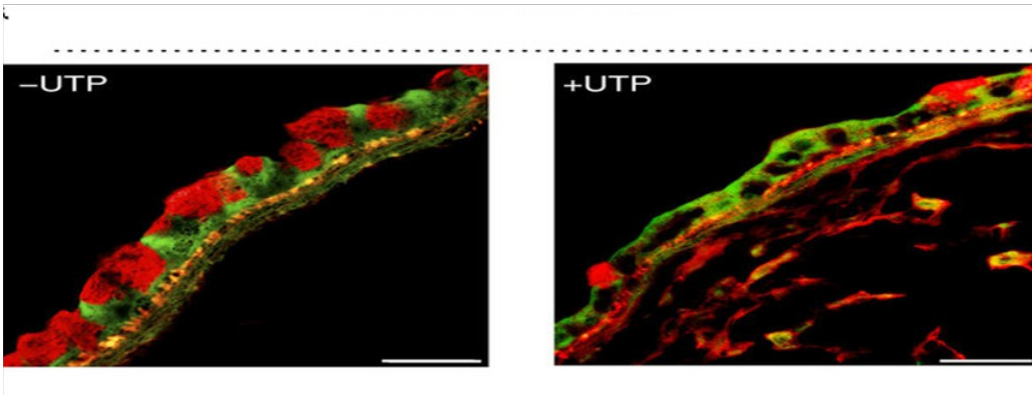
una superficie largamente idrofoba, che diventa più idrofile, in quanto lo strato proteico si sviluppa su strati sovrapposti ,che possono essere formati su superfici idrofobiche dalla deposizione di saliva intera (WMS), di origine parotidea (PS) ,sublinguale ,e sub mandibolare.Le mucine proteggono la cavità orale attraverso diversi meccanismi che sono influenzati dalle loro strutture polimeriche uniche. Innanzitutto, le mucine possono interagire con le proteine salivari per alterare la loro localizzazione e ritenzione, che potrebbe fornire una maggiore protezione per la cavità orale. Inoltre, MUC7 e MUC5B possono interagire con microbi e virus orali per facilitare la loro rimozione e / o ridurre la loro patogenicità.

FIgure 4 - Struttura ipotetica del layer mucoso (Menicagli 2004)



r

Foto 1 la rappresentazione alla Fluorescenza del Layer Mucinico



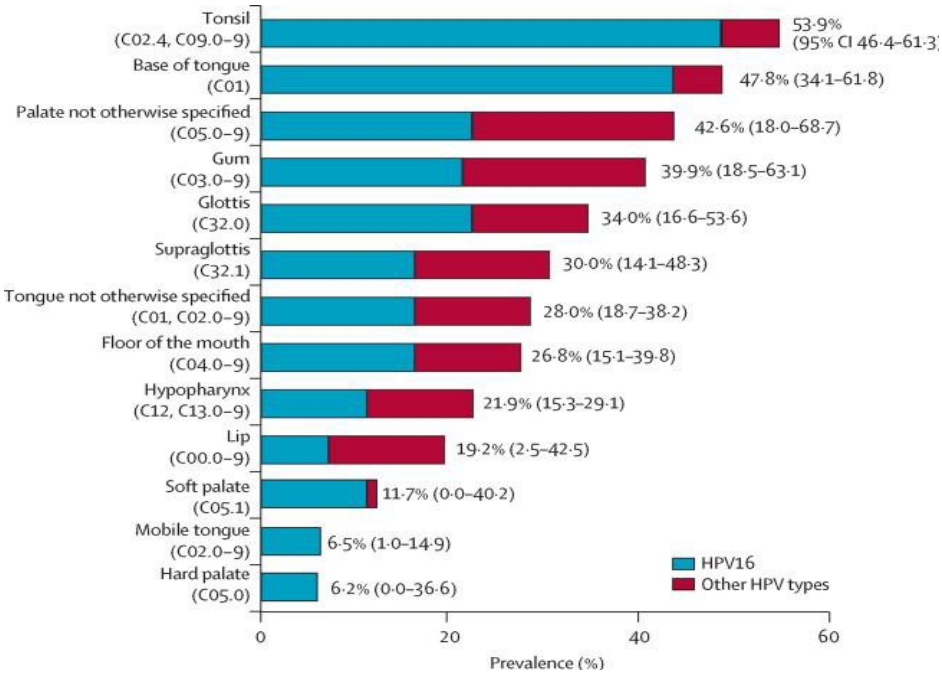
7. I FATTORI DI RISCHIO E LE NOSTRE INTERAZIONI CON I MUCINI

7-1-INFEZIONE da HPV

I dati scientifici, (15), mostrano che l'HPV ha scarso potere penetrante rispetto allo strato protettivo formato dalle mucine, contrariamente al ceppo A del virus dell'influenza, ma in ogni caso l'HPV è molto comune nei tumori orali e nella laringe (16) Il virus papilloma (HPV), che appartiene ai virus umani dei papillomi,sono piccoli virus a DNA , appartenenti alla famiglia Papillomaviridae, che infettano i tessuti epiteliali della mucosa e della pelle, inducendo lesioni proliferative,e verruche , a mani e piedi :tipiche sono le verruche, al livello del tratto genitale e del labbro respiratorio, nonché i carcinomi all'interno del cervicale uterino e laringeo . In base al loro potere cancerogeno , gli HPV oncogenici sono classificati in ceppi a basso rischio, in particolare i tipi (6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81) +, CP6108), che causano principalmente una lesione genitale benigna e tipi ad alto rischio (16,18,31,33,35,39, 45,51,52,56,58,59) associati al cancro genitale ed anale ,(più del 90% dei carcinomi cervicali

Importante, per lo sviluppo di carcinomi oro-laringei sono i tipi 16,18,6. Per quanto riguarda l'influenza dell'HPV, sono stati ottenuti, attraverso una vasta ricerca fino all'anno 2016, dati epidemiologici riguardanti (16), la diffusione del virus HPV correlato alla testa e al collo e la sua distribuzione nei vari siti anatomici. Dai risultati pubblicati in due "revisioni sistematiche" separate, è possibile elaborare i risultati con l'analisi della effettiva incidenza , (17, 18),(fig 5)

FIGURA 5- i siti anatomici per i tumori HPV e l'incidenza di tipi HPV



L'esame critico di tutte le ricerche sulla reale influenza dell'HPV, citato sopra, suggerisce le seguenti considerazioni:

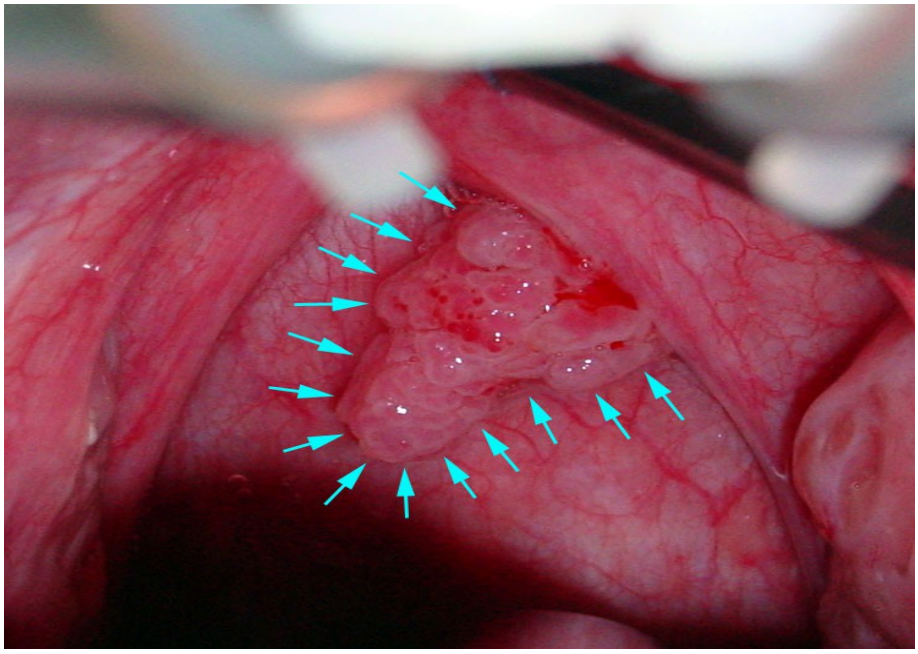
1-I dati epidemiologici , e un recente meta-analisi indicano che HPV,ha una parte rilevante solo per i tumori dell'orofaringe.

2-L'analisi dei dati e le conclusioni sull'importanza reale del virus HPV ,dipendono fortemente dalle aree geografiche in cui sono stati condotti gli studi.

3-l'incidenza del carico, di cancro da HPV, è indipendente dal consumo di alcool e / o tabacco.

4. la distribuzione anatomica dei tumori in presenza di HPV rappresenta una questione importante di carattere etiologico, perché è indubbio che lo stesso virus, statisticamente, si propaga quasi esclusivamente in punti anatomici non protetti, tonsille palatine e linguali. strato. (Vedi foto 2 sotto).

FOTO 2 -HPV: INFEZIONE DELLE TONSILLE



7-2-FUMO E ETA’

La natura pericolosa del fumo di tabacco è causata dalla formazione di un aerosol contenente in aggiunta alle particelle di nicotina / mL circa 1010, costituito da materiale altamente polimerico, carbonioso poroso con metalli pesanti, idrocarburi adsorbiti policiclici aromatici, PAH, aza-areni, N-nitrosamine (21) La fase particellare del fumo di tabacco contiene almeno 3500 composti chimici e una percentuale elevata degli stessi, sono tossici, cancerogeni o mutageni (es. Benzene, 2-naftilammina, 210Po, 226Ra , 228Ra, nichel, cadmio, benzo [a] pirene, ecc.). Ci sono almeno 55 cancerogeni nel fumo di sigarette che sono stati firmati, da IARC con "prove sufficienti per la cancerogenicità" (22). Un altro grande rischio relativo al fumo di sigarette è quello derivante dalla formazione durante la combustione di uno stress forte "ossidativo" chimico che coinvolge praticamente tutti i componenti presenti nel tabacco e che porta alla formazione di radicali liberi. In termini molto semplici, un radicale libero è un atomo con un elettrone spaiato che è "molto reattivo" in quanto cerca di stabilizzarsi cercando un altro elettrone da un altro atomo ",con il risultato di un processo che provoca una "reazione a catena. Nel fumo le temperature di combustione sono molto elevate ,e in queste condizioni è stato calcolato che, considerando che una fumata standard è pari a circa 35 cm ^{3,} e che una sigaretta viene consumata in circa 10 inalazioni , la quantità di radicali introdotti nell'organismo è in una gamma di $10^{13} \div 10^{18}$ / sigaretta fumata. (23) .I radicali liberi hanno la loro attività tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in quantità, che non possono essere inattivati dai sistemi di difesa delle cellule.. In questo caso

essi possono reagire con tutti i componenti della cellula stessa, e della matrice cellulare, provocando così una condizione chiamata "stress ossidativo". Tutte le classi di molecole biologiche sono potenziali "bersagli" per l'attacco dei radicali liberi e in particolare le membrane cellulari .La malondialdeide,(MDA), come prodotto finale della perossidazione lipidica, è una molecola chimicamente attiva e può avere effetti nocivi, in particolare sulle proteine a livello molecolare, potendo diffondere facilmente nelle cellule circostanti. La saliva contiene sistemi di difesa antiossidanti per contrastare l'effetto tossico di specie radicali, formate dagli enzimi , superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GSH-Px), e dallo strato di mucina.Il fumo di sigaretta contiene anche molti tipi di ossidanti, Radicali liberi e Aldeidi volatili, che possono, in ogni caso, danneggiare le biomolecole cellulari. Molti studi , mostrano (24) che i radicali liberi degradano le proteine e che le mucine sono modificate in entrambe le parti ,sia quelle glucidiche che quelle prettamente costituite da aminoacidi. Le mucine sono suscettibili di attacco da specie di ossigeno reattivo durante le quali si perdono gli zuccheri terminali e sono frammentate sia le proteine che gli zuccheri. Una ricerca recente (26) ha studiato le interazioni dei radicali liberi,con alcuni componenti della saliva compresa la mucina e ha mostrato che si forma un complesso mucinico a più basso peso molecolare nella saliva dei fumatori. Importante, oltre ad ogni alterazione della struttura molecolare delle mucine, è anche la loro riduzione quantitativa in termini di percentuale dell'intera frazione proteica presente nella saliva. La concentrazione delle mucine è considerata normale in un range che varia dal 15% al 20% in peso rispetto al totale delle proteine salivari. In questo studio presentiamo i risultati preliminari che

abbiamo ottenuto , sugli effetti dell'abitudine al fumo, sulle proteine salivari totali e sulla frazione delle mucine totali, in un gruppo di fumatori con un'età di ≥45 anni, rispetto ad un gruppo di controllo, con lo stesso età media , in modo da verificare gli effetti del tabacco anche in funzione dell'età stessa,. Questi risultati sono espressi nella tabella 4, mentre nella tabella 5 èsono riportati i risultati del Fisher exact test per verificare le eventuali differenze tra i fumatori e i gruppi di non fumatori con l'età ≥ 45 anni

TABELLA 4 I valori di MDA, proteine salivari totali, mucine salivari totali, nei fumatori, non fumatori con età ≥ 45 anni e in non fumatori con età ≤ 45 anni

	SMOKERS				NOT SMOKERS AGE≥45 YEARS				NOT SMOKERS AGE ≤45 YEARS		
AGE	MDA	T.S.P Initial value	T.S.M Effective value	AGE	MDA	T.S.P Initial value	T.S.M Effective value	MDA	T.S.P Initial value	T.S.M Effective value
46	**5,2**	300	27	**54**	3,9	330	32	≤3	330	44
71	5	340	32	**78**	1,9	330	34	≥3	330	50
73	**5,5**	334	31	**77**	4	340	32	≤3	329	52
72	**3,9**	352	34	**55**	3,6	340	33	≤3	340	53
70	**4**	336	40	**55**	2,4	318	32	≤3	338	49
66	**4**	352	31	**52**	3,3	336	37	≤3	316	52
65	**6,1**	350	34	**70**	2,6	356	33	≥3	350	40
66	**2,2**	322	34	**53**	4,2	321	33	≤3	321	52
55	**6,9**	343	38	**59**	2,8	322	32	≤3	346	32*
54	**5**	347	33	**54**	3,2	349	41	≤3	319	49
49	**2,6**	354	39	55	3,3	354	42	≤3	354	49 *
55	**3,9**	342	33	**55**	2,1	322	35	≤3	333	55
46	4,1	322	34	50	2,6	340	35	3,2	333	46
47	4,5	333	29	45	3,7	340	40	3,5	334	39

LEGEND T.S.P ,Total salivary proteins ; T.S.M Total Salivary Mucins; MDA expressed as ngr/ml

Table 5 ; Results of Fisher Exact for the values of MDA in Salivary Mucins in smokers and not smokers group with age ≥ 45 years expressed in table 4

Results FISHER EXACT SMOKERS VS NO SMOKERS AGE ≥ 45 YEARS			
	Category 1MDA	Category 2 TOTAL SALIVARY MUCINS	***Marginal Row Totals***
Group 1smokers	12	9	21
Group 2not smokers	9	3	12
Marginal Column Totals	21	12	33 (Grand Total)

RESULTS FISHER EXACT TEST p=0.04678 ,

DATA INTERPRETATION

Test T in smokers vs no smokers age ≥ 45 years p=0,01951

Test T results for TOTAL PROTEINS in smokers, vs not smokers age ≥ 45 years, p = 1,19238E-08 ; p≤ 0.05

Test T results for TOTAL MUCINS in no smokers with age ≥45 years ,vs control, p = 9,83628E-08 ;p≤0.05

Table 5 : the values of MDA and SALIVARY MUCINS in smokers and not smokers group with age ≥ 45 years ; p =0,4678

Based on this statistical analysis it may be concluded that:

1) Be smoking involves significant increase in MDA compared with the control.

2) Older age ≥45 years, it has a significant effect on increasing of MDA, both in smokers than non smokers

3) The smoke results in a significant decrease of total salivary mucins vs control

4) dalla tabella 5 è possibile vedere che la differenza di concentrazione di mucine salivari nei fumatori, con MDA ≥ 3 μgr / ml, rispetto ai non fumatori di età o di età superiore a 45 anni non è statisticamente significativa. La spiegazione di questo risultato può essere spiegata ammettendo la teoria di Harman (27) o ipotesi mitocondriale, già espressa nel 1956. La disfunzione mitocondriale è da tempo considerata una delle cause principali dell'invecchiamento e delle malattie legate all'età. La teoria dei radicali liberi mitocondriali dell'età dipende dal fatto che le mutazioni del DNA mitocondriale somatiche, che si accumulano durante la vita, provocano eccessive produzione di specie reattive di ossigeno che danneggiano le macromolecole e compromettono la funzione delle cellule e dei tessuti. Infatti, gli studi hanno dimostrato che la capacità ossidativa massima diminuisce con l'età, mentre l'ossigeno aumenta la produzione di specie altamente reattive. . L'ipotesi di Harman è stata seriamente contestata da recenti studi che dimostrano che le specie reattive dell'ossigeno evocano la salute metabolica e la longevità, forse attraverso meccanismi che includono l'autofagia. Questa teoria è stata contestata, modificata e/o estesa da molti autori, ma

rimangono due argomenti fondamentali a sostegno di essa: in primo luogo, si è dimostrato che uno squilibrio tra antiossidante / ossidante si verifica con l'invecchiamento e questo si traduce in un accumulo di macromolecole ossidate e danneggiate In secondo luogo, l'accumulazione delle cause di danno ossidativo , coinvolge la formazione di un fenotipo invecchiato e degenerato. Questo secondo punto è quello che è più in discussione recentemente contestato da diversi studi recenti (28).I risultati del nostro studio ,giustificano l'ipotesi mitocondriale ,ma anche bisogna considerare che gli stessi possono essere derivati dalla, riduzione del meccanismo di difesa ,garantito dalla mucosa orale,che anch'essa diminuisce con l'età, diminuzione relativa al cambiamento di alcuni parametri ,come flusso salivare, o la concentrazione delle mucine Infatti,è noto ,che il processo di invecchiamento è associato ad un flusso salivare ridotto, in specifiche ghiandole salivari, e con la diminuita produzione delle proteine salivari. Questi processi di riduzione del flusso salivare e delle proteine, sono osservati anche con l'uso di farmaci,il cui uso aumenta generalmente con l'età. Questi risultati hanno importanti implicazioni cliniche per mantenere la salute orale ottimale negli adulti più anziani, 29), (30), (31) ,.

7-3 –STILI di VITA: ALIMENTAZIONE E FARMACI

I composti presenti nel cibo,possono influenzare la struttura dei componenti di tutte le proteine salivari come avviene nel caso del consumo di betel,il quale notoriamente è implicato nella formazione di tumori orali in grandi porzioni dell'Asia sudorientale. Altri composti come. le lectine vegetali, trovate in semi, frutta a guscio, patate e fagioli, hanno la capacità di legarsi

a mucine e a o-glicani . In ogni caso, il processo più importante della precipitazione delle proteine salivari è la diretta conseguenza della presenza in molti prodotti dietetici, di un importante gruppo di composti chimici, di origine vegetale, i polifenoli. È chiaramente dimostrato che i polifenoli sono presenti in quantità elevata, nel betel (fino al 30% in peso) e anche in un'ampia scelta di spezie di consumo come paprika o nel tè verde .I polifenoli possono interagire con i vari componenti salivari, con la possibile conseguenza di una precipitazione delle proteine presenti in essa.. Recentemente sono stati analizzati, in diversi studi, gli effetti dei polifenoli, come quelli contenuti nel tè verde, nella paprika e, nel betel, sulle principali mucine salivari, MUC5B (gel forming), e MUC7 (non agente gelificante),ovvero sui principali fattori che costituiscono lo strato mucoso,la barriera protettiva della cavità orale.

7-3-1-BETEL

L'origine della masticazione dell'abitudine, il seme dell'areca catechu (il nome del seme Areca e del betel sono utilizzati in modo intercambiabile), si trova specialmente nell'Asia sudorientale, probabilmente in Malesia dove l'etimologia del nome della provincia di Penang indica esattamente "areca-nut". Gli antichi scrittori orientali hanno lasciato prova del fatto che la pratica di masticare Betel in Cina e in India è ben consolidata già più di duemila anni (32).Di questa pianta,o meglio dei suoi semi,sono stati riportati una serie di effetti applicati nella medicina ayurvedica (33), come droga antimilintica, stimolante dell'appetito, rinfrescante dell'alito,, diuretico, lassativo, tonico del sistema nervoso. L'areca-nut (la frutta o la noce Areca

catechu) è comunemente consumato da persone di Asia,foto 3, e comunità asiatiche emigrate in Europa e Nord America. In quest'ultimo caso, il consumo sembra anche legato all'aspetto religioso. Le comunità indiane nel Regno Unito sono i principali consumatori del betel (fino all'80% degli adolescenti e degli adulti della comunità), mentre la comunità Sikh consuma meno (50% degli adolescenti e degli adulti);il consumo infine è sconosciuta tra gli indiani e Musulmani del Pakistan.In genere il seme viene masticato dopo essere stato diviso in porzioni sottili, combinate con una varietà di altri prodotti naturali (compreso il tabacco) e avvolti nella foglia di pepe(betel) (Piper betel),foto 4,5

FOTO 3 - Un mercato tipico dove vendono il betel



FOTO 4 - THE BETEL PREPARATION WITH LIME



FOTO 5 –BETEL WITH LIME AND TOBACCO



La bocca e i denti dei soggetti che masticavano il betel continuamente ,insieme o no scaglie di calce spenta assume rapidamente un colore variabile dal rosso al marrone vedi foto 6

FOTO 6 -Gli effetti visibili del betel sulle mucosa orali



Questi soggetti manifestano generalmente , intorpidimento della lingua e bocca secca,(xerostomia marcata). Nei neo consumatori, possono verificarsi una sensazione marcata nella gola e nell'esofago, (34), (35), (36). di restringimento. Circa lo 0,5%-2 %, degli utilizzatori di betel sviluppa una fibrosi sub-mucosa orale cronica, una malattia caratterizzata da atrofia epiteliale e accumulo di collagene nella mucosa orale. Responsabili di questo effetto avverso sembrano essere catechine e tannini presenti nel betel , che agiscono stabilizzando il collagene e rendendolo resistente alla collagenasi sia umana che batterica, divenendo, la mucosa orale uno strato non elastico,

poroso e facilmente penetrante da molti piccole molecole. Il 15% di questi soggetti ha successivamente sviluppato anomalie tissutali (cellule atipiche), mentre nel 12% dei casi si verifica insorgenza di tumore delle cellule squamose. In questo caso si può parlare veramente di emergenza Betel, soprattutto quando questo comporta rischi nei giovani. L' incidenza in questo gruppo , è aumentata ad esempio in Taiwan da 550 a 6.000 casi all'anno, e sei volte è l' aumento della mortalità . (37).Taiwan è il paese leader mondiale nel cancro orale per l'età compresa tra i 30-54 anni. Il betel quid (BQ) ,è stato classificato dallo IARC, (38, masticato con o senza tabacco, come cancerogeno umano del gruppo I nel 2004. Le persone sono più interessate a questo fenomeno,sono quelle presenti nella classe socioeconomica inferiore e preferiscono masticante betel con il fumo e l'alcool bere in combinazione, peggiorando così la salute .Nonostante ciò moltissime persone al mondo, non vedono il pericolo del BQ da solo,e capire l'interazione sinergica,ancor più negativa tra BQ e fumo .Il risultato è che vengono anche consumate dalle 30-40 associazioni orali combinate ogni giorno, 15-20 sigarette e 15 BQ , da quasi 2 milioni di adulti, e ciò si può considerare un disastro per la salute pubblica,dei paesi della Asia sub orientale.. Ogni anno un totale di 6.000 nuovi casi di cancro orale e 18.000 morti si verificano come risultato del masticare BQ. Il rischio di cancro per via orale riguardo all 'aspettativa di vita tempo di un chewer è inferiore del 42%, Il cancro orale è in rapida crescita negli ultimi due decenni a Taiwan, con un aumento di dieci volte di uno su due chewers. Questo dato è quasi 40 volte più grande del rischio di vita dell'adulto medio americano, pari a 1,08%. , Mentre il controllo del tabacco è in pieno svolgimento a Taiwan, l'atteggiamento governativo è ancora oggi, tutt'altro che

aggressivo verso il controllo del BQ, riconoscendo e rispondendo alle grandi associazioni di gruppi di interesse relativi al BQ, cioè i coltivatori, i distributori, i rivenditori e i consumatori. La letteratura scientifica da tempo studia , praticamente tutte le componenti chimiche del betel per cercare di capire il loro ruolo nei meccanismi di carcinogenesi delle labbra e della cavità orale. Può essere secondo molti,responsabilità dei metaboliti dell'arecolina , "di tipo nitrosammine" derivanti dal degrado di questo composto con l' ossigeno o "ossigeno attivo" formato nella reazione tra le sostanze di base del betel e i composti di tipo flavonoide come le catechine presenti in buona quantità, (5-10%) nel seme di Areca Catechu. E' estremamente interessante, a questo proposito è la monografia IARC (38) recentemente pubblicata, anche se,alla luce di un nostro studio , riteniamo che il processo fondamentale,che porta alla cancerogenesi ,in realtà parta dal deterioramento del layer mucinico da parte dei tannini Il tannino infatti,è in grado di precipitare tutta la frazione proteica presente nella saliva, privando la mucosa orale della sua difesa più efficace in pratica, il "sequestro" di mucina da parte dei tannini avviene perché le mucine sono molto ricche della prolina , e ciò comporta , chimicamente la formazione di un aggregato molto stabile e insolubile in acqua, a seguito della formazione di legami dei gruppi OH- presente nei tannini, con l'ossigeno delle proteine,formando un legame di tipo cheto-imide -CO-NH-peptide-prolina Il modello per una spiegazione della interazione tra le proteine salivari e con esse della stessa frazione di mucina e i composti dei polifenoli è mostrata nelle figura 7 ,mentre nella foto 7, è possibile vedere il risultato finale di detta precipitazione

Figure 7- L'ipotesi proposta concernente il meccanismo di interazione Polifenoli-Proteine

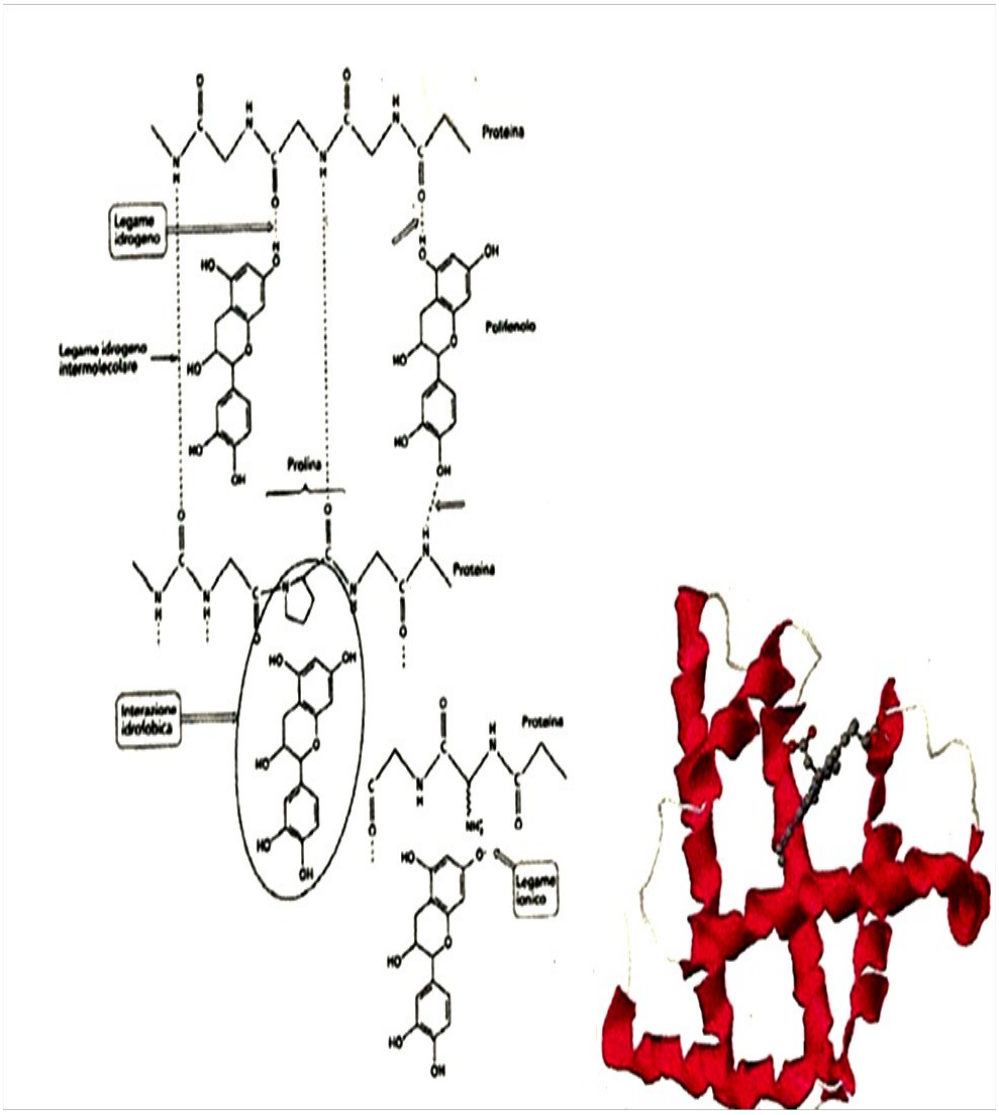


PHOTO 7- I Tannini e La Precipitazione delle proteine salivari



Una precipitazione delle proteine, è un problema molto importante, nella masticazione del betel, abitudine quotidiana ,ripetiamo , per circa 500 milioni di persone in tutto il mondo, soprattutto in alcuni paesi dell'Asia. Qui gli effetti sono molto più rilevanti, e rispondono con un'incidenza di tumore orale molto elevata: indice ASR (tasso di normalizzazione dell'età), per esempio in Papua Nuova Guinea = 25,4.

I dati ottenuti in questo nostro recente studio sono, infatti, molto correlabili con quelli di un precedente lavoro (39) e che riguardano la pericolosità del consumo di betel, nella possibile formazione di carcinomi della cavità orale contemporaneamente all' effetto dei tannini sulla lingua e su tutte le membrane mucose

,come si può ben vedere dalla foto 5.In un nostro recentissimo studio ,in press, abbiamo ulteriormente ridotto la quantità di tannini utilizzati rispetto a quelli che si assumono comunemente, durante una singola masticazione di betel (fino a quindici volte inferiore),per vedere gli effetti sia sulle proteine ,sia sulle frazioni muciniche. Rispetto alla precedente ricerca, abbiamo infatti anche analizzato la precipitazione delle mucine totali per vedere se ci fosse un comportamento diverso, nel processo di interazione con i composti polifenolici, date le differenze strutturali, relative alla componente glucosidica delle mucine. I risultati sono analizzati statisticamente, con il Mann-Whitney U Test e con il Test di Correlazione del Coefficiente Pearson Il test Mann-Whitney U è un test non parametrico che consente di confrontare due gruppi o condizioni o trattamenti senza fare ipotizzare che i valori siano normalmente distribuiti. Requisiti: Due campioni casuali indipendenti . I dati sono continui - in altre parole, è in linea di principio possibile distinguere tra i valori al n decimale. Rho Calculator di Spearman: Rho di Spearman è un test non parametrico utilizzato per misurare la forza dell'associazione tra due variabili, dove il valore r = 1 significa una perfetta correlazione positiva e il valore r = -1 significa una perfetta correlazione negativa. Il coefficiente di correlazione rho di Spearman è stato utilizzato per analizzare la correlazione tra il pH e l'assorbimento del% della proteina. :p value inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi mentre , a causa della piccola dimensione del campione, p-values compresi tra 0,05 e 0,1, sono stati trattati come tendenza

Tabella 6 - saliva 1 l'effetto del tannino sulla precipitazione delle proteine totali e mucina totale,

SALIVA A (ml)	pH 7.5	TANNIN mg	TOTAL MUCINS mg/dl =40	% Precioitation	Total Proteins mg/dL	% Precioitation
15	7,5	1	26	35	200	41
15	7.4	2.5	12	70,0	135	61
15	7.3	5	8	80	78	77
15	7.	7,5	5,7	86	61	82
15	6,9.	10	3,6	93,7	34	90
15	6,8	12,5	1,9	97,2	20	94
15	6,6	15	0,2	99,6	3	99
15	6.6	17,5	0	100	0	100

Table 7- saliva 2 the effect of the tannin on the precipitation of the total proteins and total mucins

saliva B ml	**pH**	**Tannin**	**Mucins 43 mg/dl**	**% precipitation**	**Total Proteins 350 mg/dl**	**% precipitation**
15	6,5	1,0	34	27	241	32
15	6,4	2,5	26	52	191	47
15	6,4	5	16	62,	140	60
15	6,3	7,5	10,3	76,	92	74
15	6,0	10	6,7	84	60	83
15	5,9	12,5	3,3	92	35	90
15	5,8	15	0,8	98,2	7	98
15	5,7	17,5	0,	100	0	100

Table 1 Mann-Whitney Proteins VS Mucins;

The U-value is 34. The critical value of U at $p < .05$ is 22. Therefore, the result is not significant at $p < .05$.

The Z-Score is -1.04155. The p-value is .29834. The result is not significant at $p < .05$..

Table 2 Mann-Whitney proteins VS Mucins

The U-value is 33. The critical value of U at $p < .05$ is 24. Therefore, the result is not significant at $p < .05$.

The Z-Score is -1.33978. The p-value is .18024. The result is not significant at $p < .05$.

TEST T FOR TWO MUCINS (DEPENDENT MEANS ; DIFFERENT VARIANCE

The value of t is -3.586447. The value of p is 0.008899. The result is significant at $p \leq 0.0$The

TEST T FOR TWO PROTEINS : DEPENDENT MEANS ; DIFFERENT VARIANCE

The value of t is -3.578390. The value of p is 0.008995. The result is significant at $p \leq 0.05$.

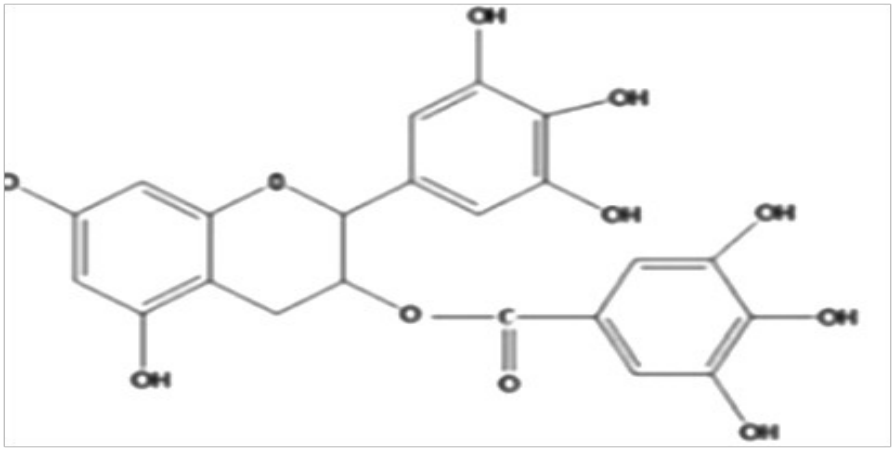
. In questo caso , a causa della piccola dimensione del campione, p-values, compresi tra 0,05 e 0,1, sono stati discussi come tendenza

I risultati di Rho Calculator di Os Sperman sono per tutti i test risultano ≥ 0.9

7-3-2-GREEN TEA,(Tè Verde)

La precipitazione di proteine e mucine da parte di composti tannici è legata alla presenza in essi di molecole polifenoli che e prevalentemente da epigallocatechin-3-gallato (EGCG), fig 8,presente in alta concentrazione in molti alimenti vegetali. Le mucine salivari che contengono MUC5B (gel forming) e MUC7 (che non formante gel) sono come abbiamo visto, importanti contributori alla barriera protettiva del muco nella cavità orale . E' possibile che molti alimenti possano influenzare le proprietà della barriera, a priori in modo del tutto inaspettato .In questo senso , con studi sperimentali ,è possibile dimostrare come un composto , presente nel tè verde, l'epigallocatechin gallato polifenolico (EGCG), possa alterare sostanzialmente le proprietà sia della rete polimerica MUC5B che della MUC7 monomerica

Struttura chimica del EGCG



Questo polifenolo ,è il più abbondante della famiglia, presente nel tè verde ,ed ha anche le capacità più astringenti ;l' EGCG, ha dimostrato di interagire con una serie di proteine salivari, (39),interazioni ben documentato con le cistatine, gli istatine e l'amilasi,che vengono precipitate facilmente da EGCG (40). Il meccanismo dell'aggregazione proteica indotta da EGCG è stato oggetto di numerosi studi, (41), (42); le principali conclusioni indicano che le fasi principali comportano , l'associazione iniziale di EGCG alla proteina,la formazione EGCG di ponte di molecole proteiche legate all'EGCG,ed infine l'aggregazione proteica . Il tè verde contenente moderate quantità di polifenoli, a volte espresso come equivalente epigallocatechin gallato (EGCG), può alterare in modo significativo sia le proprietà, sia la rete polimerica di MUC5B e il MUC7 monomerico, come è stato verificato utilizzando tecniche particolari " (43), per la frazione MUC5B presente in un campione di saliva umana Nel nostro recente studio, è stato osservato, la precipitazione di proteine e mucine in due campioni di saliva, dopo l'aggiunta di estratto di tè verde. Questo fenomeno, non è però statisticamente correlabile, all'aumento delle aggiunte di estratto di tè ,ovvero alla quantità dei composti di polifenoli nel tè verde, ma evidenzia comunque una tendenza,di tipo asintotico.. I risultati di questa tendenza sono espressi dal valore massimo di precipitazione delle proteine del 32% e del 57,6%,per le mucine totali .Questi valori ,comunque vengono ottenuti , con concentrazioni di polifenoli circa dieci volte più elevate di quelle che possono essere consumate ogni giorno,bevendo una modica quantità di tè verde . Comunque questo processo è molto importante, con un enorme impatto sulla salute della cavità orale. Un recente studio

epidemiologico,infatti, collega,l' incidenza crescente, del cancro orale in Cina, con un elevato consumo di tè verde (44).

7-3-3-PAPRIKA

La paprika è una spezia tipica dell'Ungheria, ormai frequentemente utilizzata in tutto il mondo. Viene ottenuta essiccando e poi polverizzando i peperoni, principalmente il genere Capsicum, dopo aver rimosso la membrana interna dai semi, dove è contenuta la maggior quantità di capsaicina. La paprika è ampiamente utilizzata nella preparazione del gulash e come ingrediente che si mescola con carni e altri alimenti ,perfino dolci. Dai dati di letteratura molto carenti in verità, (per la paprica in quanto tale ,si ha solo un riferimento) (45) si può trarre che vi è una concentrazione media di polifenoli totali espressi in mg / gr, tra 1,5 e 4,0 con un valore massimo di 7,0 mg / Gr per un particolare tipo di peperone da cui è stato preparata (46), (47) Questi valori indicano come la paprica può essere considerata una fonte di polifenoli piuttosto elevata, mentre l'uso di spezie che li contengono in quantità elevate sono più limitate nei consumi

I dati epidemiologici hanno dimostrato che (48) l'Ungheria è leader in Europa, sia per la morbilità che per la mortalità del cancro orale, e che il tasso di mortalità per i tumori della cavità orale è notevolmente aumentato nel periodo 1975-2002, sia per la popolazione maschile che per la femminile. Nel nostro studio è stato condotto un esperimento simulando, per quanto possibile, un contatto tra una normale produzione di saliva, prodotto durante un periodo di pasto di 25-35 minuti (circa 25 cc) e il peso equivalente di paprika che può essere ingerito (circa un

grammo),gustando una porzione del più tipico piatto della cucina ungherese : il goulash.

Questo studio ha stabilito che le proteine salivari possono essere precipitate dalla paprica (2,5 mg / gr) e dai suoi polifenoli, con un piccolo contributo della capsaicina. In queste condizioni c'è una notevole diminuzione delle difese strutturali della cavità orale, probabilmente,accentuata in condizioni di approvvigionamento continua dei cibi ricchi di paprika

Il popolo ungherese, praticamente usa, in tutti i cibi, anche nei dessert),la paprica ,e questo può provocare uno stato di mancanza cronica di mucine salivari I risultati delle precipitazioni delle proteine non sono statisticamente correlate con l'aumento delle concentrazioni e con il tipo sia di paprica, $p \geq 0.05$,impiegato ma mostrano un fenomeno di tendenza con gli stessi valori, o meglio una forte correlazione tra i due parametri. Prova 1 precipitazione massima 23% (rho = 0,95, prova 2 precipitazione massima 23,1% (rho = 0,91). L'aggiunta della capsaicina da sola rileva una tendenza statistica alla precipitazione, con un massimo del 10%, per le concentrazioni però cinquanta volte quelle trovate in due campioni di paprika

7-4-FARMACI E MUCINE

7-4-1- CORTICOSTEROIDI

L'uso di corticosteroidi inalati comporta, in particolare per il loro uso prolungato, come avviene molto spesso, effetti secondari sulla gola e la laringe, come l'infezione da candida , di bocca e di gola, tosse e raucedine. Questi effetti collaterali,suggeriscono, che essi possono derivare da una alterazione dello strato

protettivo delle mucose oro-laringeali. Per le loro proprietà antinfiammatorie, i farmaci cortisonici, sono usati con successo nel trattamento delle malattie respiratorie come asma e fibrosi polmonare: l 'attività farmacologica dei corticosteroidi è molto complessa, ma può essere sintetizzata attraverso l'esplicitazione di questi principali tappe biochimiche :

A-interazione e formazione di un complesso tra i corticosteroidi con una proteina glicosilata (GR) per formare un farmaco ancora non attivo (CCP), (49), (50), (51), (52), (53).

B-trasporto del (CCP) alle cellule bersaglio

C-penetrazione del (CCP) nelle cellule e legame al recettore citoplasmatico,

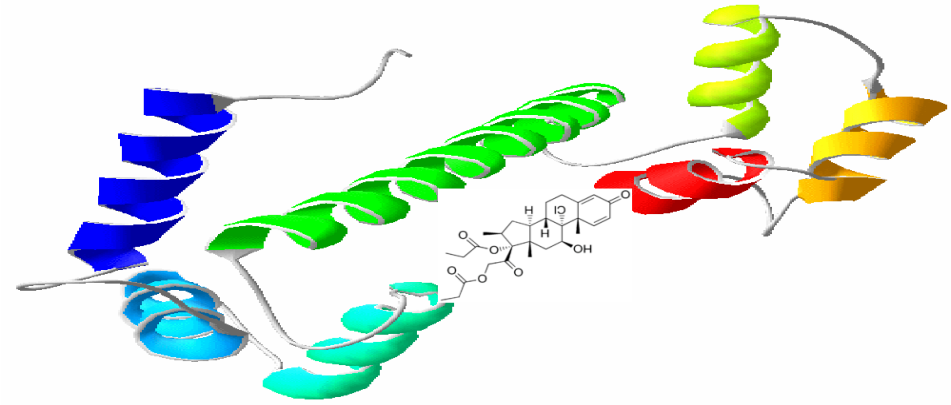
, D- attivazione delle proprietà antinfiammatoria dei cortisonici

Il complesso (CCP penetra nel nucleo e interagisce con il DNA che attiva o inibisce la trascrizione del gene, responsabile dei principali processi infiammatorie. Su questi, sono espliciti gli effetti farmacologici dei corticosteroidi. Per i particolari effetti collaterali , in questo campo di applicazione, sono stati verificati gli effetti di due corticosteroidi impiegati come aerosol in molte malattie respiratorie, su proteine salivari in due campioni di saliva fornite dai volontari. I due tipi di due corticosteroidi , sono stati impiegati in molte concentrazioni: al dosaggio normale di impiego terapeutico, il valore del precipitato delle proteine salivari totali, è di circa il (21%), per il beclometasone , fino ad un massimo del 31% per una concentrazione tre volte superiore a quelle normalmente usate per scopi terapeutici. Una

spiegazione della possibile interazione tra le proteine salivari e i corticosteroidi è schematizzata ,e mostrata in figura 8

nella quale si può vedere come il farmaco si inserisca ,nella struttura proteica ,formando con essa legami ,relativi a interazioni a carattere idrofobico ,e a forze di Van Der Walls

FIGURA 8 L'interazione dei corticosteroidi con le protein



In un recente studio (55), l'interazione di mucine con tre diverse classi di farmaci (teofillina, prednisolone e cefalexina) è stata studiata a diverse temperature con diversi metodi spettroscopici. La spettroscopia UV-Vis ha mostrato che tutti e tre i farmaci esaminati possono legarsi alla mucina per formare un complesso proteico-farmaco. Secondo i parametri termodinamici (valore positivo DH e DS) le forze di idrogeno e le forze van der Waals possono svolgere un ruolo importante nella stabilizzazione del complesso mucin-prednisolone. E 'stato successivamente pubblicato uno studio simile (56) ,condotto su 103 persone (49 controlli e 54 pazienti sottoposti a trattamento regolare con corticosteroidi inalati (IC). Non sono state osservate differenze nelle co-morbidità o nelle abitudini di fum,ma i pazienti trattati

con dosi elevate di IC hanno mostrato livelli inferiori di MUC5B salivare rispetto a quelli trattati con dosi medie di IC o quelle non trattate . Le conclusioni di questo studio sono che nei pazienti con asma, al trattamento con dosi elevate di CI sono associati a livelli ridotti di MUC5B salivare. In un nostro studio (57), (in stampa) sono stati analizzati gli effetti di tre corticosteroidi, Beclometasone, Butesomide, Fluticasone, usati come inalatori , sulla precipitazione delle proteine e mucine totali salivari. I risultati mostrano una precipitazione, (32%) delle mucine per il beclometasone, il 30% per il butesomide e il 7% per il fluticasone. La quantità delle mucine, precipitate da beclometasone e il butesomide ,in funzione della concentrazione media del farmaco usato,e, statisticamente significative $p \leq 0,05$, rispetto alle proteine totali,ma non per il fluticasone, $p = 0.092$. In ogni caso questi dati mostrano chiaramente che esiste l'interazione dei corticosteroidi con la saliva intera, precipitando le mucine. Questo risultato è probabilmente dovuto alla formazione di un complesso di mucina-farmaco ,con la realizzazione di un nuovo Struttura, successiva ad una possibile alterazione del back-bone peptidico e dal cambiamento di polarità intorno al residuo triptofanico . Questi risultati preliminari dovrebbero favorire la comprensione del tipo di interazione che si verifica tra mucina e farmaci. Ovviamente, per un'immagine definitiva delle interazioni di mucina-farmaci, sarebbe necessario indagare un gran numero di molecole strutturalmente diverse tra di loro, perché la precipitazione delle mucine ad opera dei corticosteroidi può diminuire le difese naturali della mucosa orale, come dimostrato anche in un altro recente studio, (58).

7-5- MALATTIE

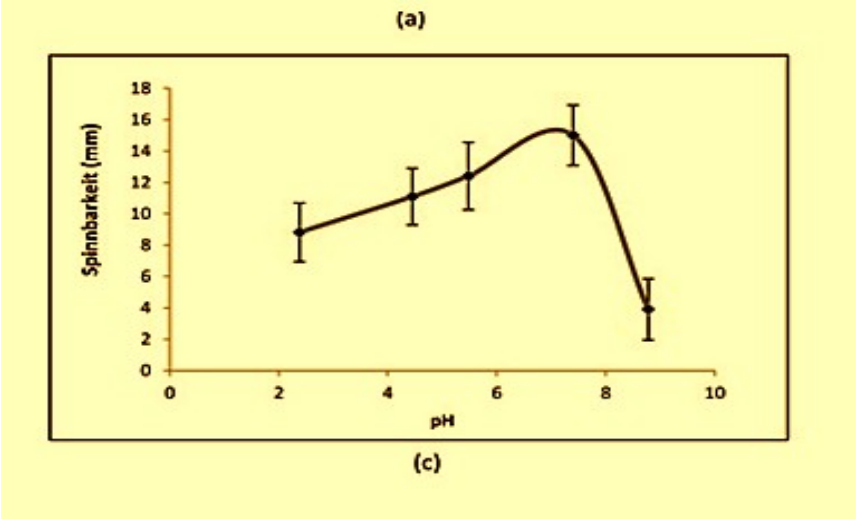
7-5-1-REFLUSSO GASTROESOFAGEO

L'esposizione all'eccesso di acido gastrico risultante dalla malattia da reflusso gastro-esofageo, noto anche come reflusso acido o bruciore di stomaco, potrebbe contribuire all'iniziazione del carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, in particolare del cancro laringeo. Precedenti studi epidemiologici , condotti fino all'anno 2016, hanno riportato risultati contrastanti, come mostrano uno studio retrospettivo,(59).. Nel complesso, i dati di letteratura ,indicano ,che un aumento delle probabilità del cancro della testa e del collo non è stato associato con una storia di sintomi di bruciore di stomaco (rapporto di odds/ratio = 0,85, intervallo di confidenza del 95% = 0,68- 1,06),sia nei casi di una precisa diagnosi medica,o di auto-segnalazione,della patologia o di una pregressa sintomatologia ,Questo studio ,non ha rilevato alcuna associazione indipendentemente dal fumo congiunto e dal bere alcolico. con il cancro alla laringe. Al contrario, altri due studi (60) (61) mostrano una relazione tra incremento di pepsina, indotta da reflusso laringeo-faringeo e carcinoma laringeo, per una probabile azione diretta della stessa pepsina, dove la sua espressione eccessiva nel tessuto laringeo aumenta nei pazienti con leucoplachia delle corde vocali e del carcinoma laringeo, in situi. In ogni caso, tali risultati con le ovvie conclusioni ,secondo il nostro parere , potrebbero trovare una spiegazione, per il fatto che , un valore costante di molto basso PH salivare , contribuisce all'alterazione del parametro fondamentale che misura e determina l'adesività e l'elasticità dello strato protettivo della

mucina che copre l'epitelio orolaringeo. Questo parametro è lo spinnbarkeit ,e nella saliva, (62), il valore di questo parametro,riflette la capacità della saliva di aderire alle superfici all'interno della bocca e della laringe, misurando quindi i valori di come aderiscano e lubrificano ,le particelle mucose ,l'intero biota orolaringeo. Pertanto, le alterazioni dello spinnbarkeit della saliva possono provocare la perdita di adesività o la capacità di legarsi a superfici che possono essere associate alla secchezza orale: in modo sperimentale, si vede che il valore minimo in mm (cut-off) non deve essere inferiore a 11-12 mm, anche se il valore ottimale è di circa 14 mm. Lo stesso studio ha dimostrato la correlazione negativa tra l'angolo di contatto (questo valore è direttamente proporzionale alla bagnabilità) e lo spinnbarkeit, per le secrezioni delle ghiandole sub-mandibolari e labiali. Campioni di saliva per i quali vi sono stati un aumento di spinnbarkeit ,hanno una diminuzione dell'angolo di contatto (maggiore capacità di bagnatura e poco adesione dell'epitelio orale). Lo spinnbarkeit della saliva è previsto per la presenza di glicoproteine ad alto peso molecolare (mucine) che si aggrega " end-to-end"; le glicoproteine di mucina e le loro strutture sono noti come fattori importanti per le proprietà reologiche della saliva. La conformazione della mucina dipende da fattori quali il pH e la forza ionica, ma sono state identificate diverse altre proprietà reologiche ,in particolare per la saliva prodotta dalle di ghiandole salivari, submandibolari / sublinguali ricche di mucina e che sono più viscose e viscoelastiche,di quelle secrete dalle parotidi. Queste diverse secrezioni salivari contribuiscono alla reologia dello strato mucoso e contribuiscono alla sua viscoelasticità e alla reologia estensiva, contribuendo al mantenimento delle normali sensazioni gustative della bocca. In

aggiunta, la saliva di origine submandibolare / sublinguale, ha concentrazioni variabili di proteine quando è stimolata da odori, masticazione o gusto ,rispetto alla saliva non stimolata. Il valore del pH della saliva dipende dal sistema di tampone bicarbonato e dalla concentrazione di ioni di calcio e K e Na, influenzando la capacità idrofile delle mucine salivari, e questo accade nelle malattie autoimmuni e nel diabete, che in genere portano ad un abbassamento del pH nella saliva, fino ai valori pari a 5,5-6. Poiché il pH della saliva diminuisce, dal suo valore fisiologico, circa pH 7,1, lo spinnbarkeit mostra una diminuzione proporzionale entro certi limiti,ad esso. Tuttavia, lo spinnbarkeit di saliva mostra una caduta ripida quando il pH è stato aumentato dalla sua linea di base, come si può vedere dai Figura tre. A questi valori di pH, il relativo valore dello spinnbarkeit è al di sotto del cut-off

Figura 9- Valore Spinnbarkeit per pH



7-5-2- DIABETE

In questo capitolo verrà esaminato un nostro studio, rivolto a comprendere , quello che può essere il meccanismo, per cui tutte le malattie autoimmuni, compreso il diabete, inducono certi tipi di alterazioni del layer protettivo. Soprattutto, potremmo capire perché solo nel diabete, ci sono risultati efficaci e sicuri dal punto di vista epidemiologico, per la sua correlazione,all'insorgenza di alcuni tipi di cancro , in assenza ,anche di altri fattori di rischio,come il fumo e l'HPV. Questa nostra ipotesi, giungerà infatti alla conclusione, che il diabete comporta modifiche, molto importanti e irreversibili, nello strato mucino salivare, consentendo ad esempio al fumo e al HPV o ad altri fattori di rischio di influenzare poi irreversibilmente la normale struttura genetica della cellula, ovvero,la possibilità di altri fattori di rischio, di alterare il metabolismo delle cellule senza trovare una barriera protettiva adeguata. Per questo studio, un questionario medico (63) è stato somministrato a un gruppo di novanta pazienti sottoposti prima a laringectomia totale. sessantasei maschi e tredici donne , Sia gli uomini,che donne, sono stati tutti sottoposti a laringectomia totale, dopo i cinquant'anni con un'età massima , di settantadue anni. Questo questionario medico è stato somministrato al gruppo di laringectomizzati, per vedere se questi pazienti, già prima dell'intervento chirurgico, avevano già sofferto di delle malattie autoimmuni e, o avessero presentato sintomi della xerostomia; le stesse domande sono state proposte a un gruppo di controllo sano che comprende sessanta uomini e trenta donne. Questo gruppo rispetta l'intervallo di età del gruppo di laringectomizzati. I risultati del questionario proposto sono stati analizzati statisticamente con il Fisher Exact Test, e questo

studio è stato fatto, sotto osservazione e controllo etico, dell'associazione italiana Laringectomizzati. Sotto il controllo dello stesso gruppo etico in questa ricerca,, abbiamo verificato le differenze nella concentrazione delle mucina salivari totali e del valore di pH,anche in pazienti diabetici, ventotto maschi non fumatori e non consumatore di alcol rispetto a un gruppo di controllo sano, anch'esso composto da ventotto maschi .I risultatisono espressi nelle tabelle 8 e 9

Tabella 8 Risultati del questionario medico

	CONTROL GROUP 60 MEN -30 WOMEN			LARYNGECTOMEES GROUP 72 MAN -18 WOMEN		
risk factor	man	women	total m+w	man	women	fisher test p-value between control and larynx group
AGE (for men ≥65 years, for women ≥60 years	45	18	63	54	12	1.000
SMOKING	42	15	57	51	9	1.000
ALCOHOL	3	0	3	6	0	1.000
CANCER FAMILY	6	9	15	12	9	0.748
XEROSTOMIA	3	0	3	22	6	0.012
HYPOGEUSIA	3	0	3	12	6	0.103
LIFE STYLE	21	9	10	8	1	1.000
AB GROUPS	12	9	21	12	9	1.000
AUTOIMMUNE DISEASES (DIABETES)	1(2)	4(1)	5(3)	23(18)	6(5)	0.9 (0.0440)

legend of table 8 : *control group sixty males ,thirty females ;** sixty-seven males and thirteen women

Risultati del fisher exact test per la xerostomia, ipogeusia nel gruppo interno dei laringectomizzati

- solo nei maschi: xerostomia p-value = 0.04950; Ip-valore dell'ipogeusia = 0,356

- solo nelle femmine: xerostomia p-value = 0.183; Ip-valore dell'ipogeusia = 0,183

Il risultato dell'incidenza del diabete,vedi tabella 9, nei maschi del gruppo laringectomizzati (25%) è statisticamente significativo, anche se confrontato con il valore dell'incidenza (1,8%), nei maschi della popolazione italiana: p- value = 0.041, con un test proporzionale. Per una spiegazione di questo risultato, è importante analizzare l'incidenza, del diabete nei maschi, in Italia. La percentuale di persone con diabete in Italia è ora al 4,3%, con un'incidenza tra i maschi e le femmine quasi identiche e comprende tutte le età. Il nostro campione di pazienti laringectomizzati, riguarda una popolazione compresa tra i cinquanta e settantatré anni, per cui, il valore di confronto, dell'incidenza, è legato a una percentuale di circa l'1,8% di persone italiane. La Xerostomia nei maschi di laringectomizzati è anch'esso un segno di rischio $p \leq 0,05$, mentre le malattie autoimmuni sono un fattore di rischio: $p \leq 0,0491$ per entrambi i sessi L'incidenza del diabete è di 25,6. % nei laringectomizzati maschi, contro l'incidenza di 1,8% nei maschi italiani. Con il Test delle proporzioni, il diabete è fattore di rischio nei laringectomizzati maschi:, $p \leq 0,05$.

Tabella 9 :the salivary mucins concentrations, and the ph value

MUCINS mg/dL		pH	
CONTROL	DIABETES	CONTROL	DIABETES
31	39,7	7,4	6
32	37	7,7	6,4
31	38,9	6,9	6
30	39,6	7,7	6
29,9	39	7,6	6,1
29,8	39	7,3	6,0
28,9	39.6	7.,5	6.0
32,1	39.7	7,1	6,4
30,9	39,8	7,4	7
33	38,8	7,4	6,0

33,4	36,1	7,2	6,0
31	38,9	7,6	6,1
31,9	38	7,6	5,9
32,1	39,6	7,6	6,6
31	38,1	7,7	6,3
33,3	37,2	7,9	5,9
31	37,4	7,9	6
31	39.8	6,9	6,1
31,3	39.7	7,4	6,2
32,1	40,1	7	6,4
32,1	39,3	7	5,9
30,9	39,2	7	6
30,4	39	7	5,9
31,1	39	6,9	5,8
30,5	38,9	7	6

			, 2
31,1	38,9	7,9	6 , 2

I risultati di Test Chi sono:: concentrazioni di mucine, gruppo di diabete / gruppo di controllo: p = 0.032

Valori pH, gruppo di diabete vs / gruppo di controllo; P = 0,047

La rilevanza statistica del diabete, nel cancro laringeo, espressa in questi risultati, concorda con uno studio pilota (Iengo M; 20213 Università di Federico II, Napoli, dati non pubblicati) e con i dati epidemiologici espressi per alcuni paesi, come Cuba e Iraq, dove non c'è assolutamente (3) un elevato consumo di alcol e tabacco, ma è presente un'alta incidenza di questa malattia. Sicuro , anche per recenti studi, è il legame tra il diabete e il cancro orale: i dati epidemiologici, eseguiti principalmente in Ungheria, dove l'incidenza del cancro orale è molto elevata (indice ASR = 9.0.),mostrano che in questo paese è possibile la correlazione dell'incidenza del diabete mellito che colpisce il 7% della popolazione ungherese e, in generale, i disturbi metabolici del glucosio ,e la sua presenza in pazienti affetti da cancro orale Questo studio utilizza dati di 14 anni con due set di dati del 1998 al 1999 e dal 2012 al 2013, raccolti in prima persona dagli autori. Questi set di dati hanno portato ad esaminare il livello di glucosio nel sangue in 267 pazienti con tumori maligni confermati istologicamente nella cavità orale. Il diabete mellito è stato riscontrato in 59 (22,1%) pazienti, mentre il nostro risultato è del 21,5%. Uno studio epidemiologico comparativo dimostra anche

che il set di dati nel 2012-2013 ha registrato un aumento della percentuale osservata di persone con diabete mellito da 17,6% a 22,1 Anche il nostro studio ha mostrato risultati molto simili, soprattutto considerando il confronto tra l'incidenza del diabete nel gruppo Laringectomizzati , rispetto a quelli della popolazione italiana. Altrettanto significativo è l'incidenza di xerostomia , sintomo indipendente dal tipo di malattia autoimmune e dal sesso. Se consideriamo che la xerostomia può essere un sintomo che indica una presenza di una mucosa orale e laringea meno efficiente nella protezione , dovremmo considerare tutte le malattie autoimmuni un vero fattore di rischio, In pratica ciò non avviene perché la letteratura non rivela nessun legame epidemiologico, ad esempio, tra la sindrome di Sjogren e i tumori della cavità orale e della laringe,ed in generale per altri tipi di cancro, Tuttavia, deve essere riconosciuto che le malattie autoimmuni, più che per il loro intervento genotossico all'interno delle cellule, inducono modifiche molto sostanziali dello strato orale di mucine, permettendo altri fattori di rischio, fumo, virus, alcool, radicali liberi, la possibilità di portare attacchi ,che possono provocare l'insorgenza del processo di cancerogenesi.. Tali cambiamenti possono avvenire principalmente in base a questi possibili meccanismi.

A- riduzione del flusso salivare e del valore del pH

B- difetto nel processo di glicosilazione delle mucine;

C- cambiamento nella concentrazione di SIgA

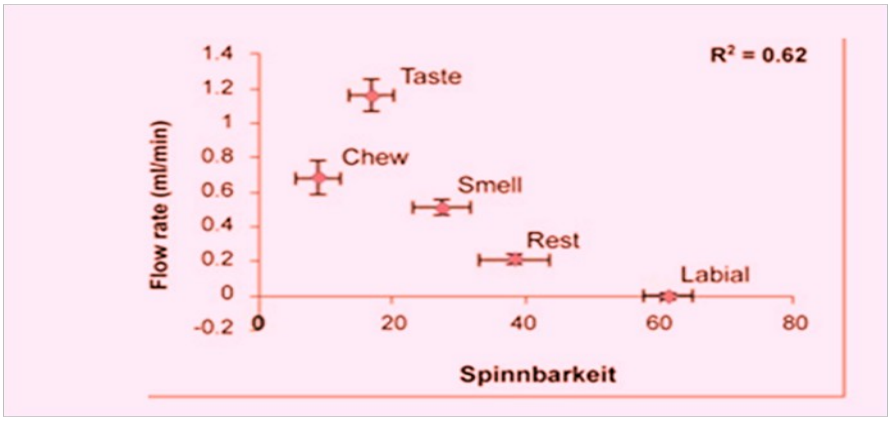
I fattori e / oi processi sopra descritti conducono tutti, alla modifica . Lo spinnbarkeit della saliva,ripetiamo ancora è quel

parametro il cui valore , riflette la capacità della saliva di aderire alle superfici all'interno della bocca, servendo quindi come indice del suo ruolo protettivo Pertanto, le alterazioni dello spinnbarkeit della saliva possono provocare la perdita di adesività o la capacità di legarsi su superfici che possono essere associate alla secchezza orale sperimentalmente (62),dimostrata in vari studi., Si vede,dalla figura 7 ,quale è il valore minimo in mm ,del (cut-off) ,che non deve essere inferiore a 11-12, anche se il valore ottimale è di circa 14 mm.

A -REDUCTION IN-FLOW SALIVA e pH

Per l'influenza del pH, è possibile mostrare, come il suo abbassamento nel diabete, fino a rapporti di circa 5,5, ha un piccolo impatto sul valore dello spinnbarkeit, come si può vedere dalla figura 9. Sappiamo che il flusso salivare può diminuire, anche se non sempre, nelle malattie autoimmuni e nel diabete, soprattutto in quest'ultimo, quando non esiste un buon controllo glicemico. Un recente studio ha dimostrato che la diminuzione del flusso salivare è direttamente proporzionale alla diminuzione dello spinnbarkeit (cfr. Figure 10), e ciò implica il basso valore dell'indice di flusso; oltre al verificarsi della xerostomia , è presente anche una alterazione dello strato di mucina, incapace di aderire sufficientemente protettivo all'epitelio orale

Figura 10 Influenza della valore di flusso su valori di spinnbarkeit



B – DIFETTO NEL PROCESSO DELLA GLICOSILAZIONE DELLE MUCINE

La modifica della glicosilazione è un evento molto diffuso, interessante circa il 70% delle proteine umane e principalmente caratteristico, delle mucine della superficie cellulare e di quelle con funzione secretiva. Un recente studio sperimentale sulla secrezione salivare. [64], ha dimostrato che solo la giusta glicosilazione delle mucine può consentire nella cavità orale, lì espletamento della funzione di fonazione,conseguentemente ad una normale lubrificazione ,con . la formazione di loci di riconoscimento molecolare necessari per proteggere la mucosa , contro batteri e virus ,nonché fornire un adeguato processo idrofilo, per creare uno strato di mucinico, avente un valore di spinnbarkeit normale. In molti studi, oltre il 90% dei pazienti con la bocca secca ,ha uno spinnbarkeit al di sotto del limite inferiore: (cut off, proposto = (11 mm). Ulteriori analisi delle mucine hanno rivelato che la ridotta glicosilazione delle mucine porta ad una sensazione di bocca secca. Il risultato di questo studio ha indicato che le concentrazioni muciniche salivari,in

realtà non sono ridotte nella bocca secca ma che la struttura della mucina (glicosilazione) è alterata. La glicosilazione non corretta può avvenire per molte ragioni intra e extra cellulari, ma la più comune comporta un difetto nella formazione del residuo terminale della catena polimerica, vale a dire della parte glucosidica , principalmente a livello dell' acido sialicoterminale. A questo proposito sono pochi gli studi che hanno analizzato il rapporto tra la quantità di acido sialico ,nella saliva ,e le malattie autoimmuni e / o il diabete; Uno di di questi , osserva che c'è una diminuzione della sua concentrazione nella saliva e l'ipotesi degli autori è che la diminuzione del livello acido sialico salivare nel diabete di tipo 1 può essere dovuta a due cambiamenti nelle attività degli enzimi che partecipano alla sintesi e al catabolismo dello stesso acido sialico

C-MODIFICA DELLA CONCENTRAZIONE DI SIgA

E' chiaro che alcune proteine salivari protettive, incluse mucine e IgA, sono concentrate sulle superfici mucose orali nella pellicola legata, attraverso interazioni specifiche. La concentrazione delle mucine contribuirebbe alla lubrificazione per prevenire danni all'abrasione ai tessuti molli, mentre il contributo della IgA potrebbe creare un "immune reservoir" contro l'infezione delle mucose. Infatti,una recente ricerca evidenzia un altro ruolo chiave di SIgA,ovvero quello che consente la costruzione dello strato di mucina in difesa dell'epitelio orale; Le mucine dell'epitelio ,mucine di membrana MUC1,possono iniziare la formazione della pellicola mucosa attraverso interazioni con le mucine secrete, MUC5B MCU7, formando legami tra i componenti i loro terminali oligosaccharidi

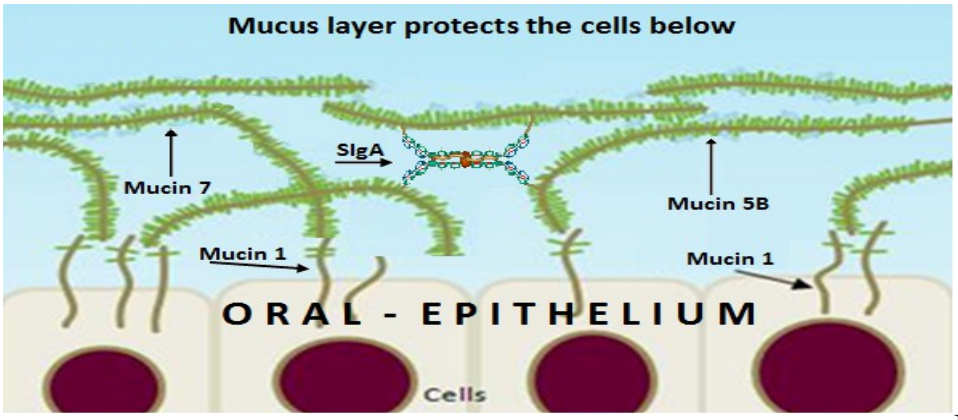
con alcuni dei domini dell'immunoglobulina. Si propone un possibile schema di interazione e successiva legazione , che concorda con l'esame cristallografico (65). Il processo di interazione di SIgA-Mucin nella saliva è molto importante, perché la stabilità dello strato di mucina,e quindi dipende anche dalla concentrazione dell'immunoglobulina ,così che la reologia del sistema mucoso è suscettibile di alterazioni quando la loro quantità è in difetto o in eccesso. Nelle malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide è spesso la diminuzione di SIgA, [66] , [67], a provocare l'aumento della xerostomia, ancor più accentuata se esiste contemporaneamente il Sjögreen secondario. Il diabete è una malattia in cui il controllo metabolico è molto difficile,e, la concentrazione di SIgA può essere più alta [68], o come in molti altri casi più bassa[69], [70]; In ogni caso i pazienti soffrono di xerostomia, e,mostrano una portata di flusso salivare , molto inferiore a quella standard e questo sappiamo che è direttamente proporzionale a un valore di spinnbarkeit inferiore alla normale cut-off

La Over Expression delle Mucine Salivari

Un altro parametro fondamentale, che dobbiamo considerare , quando vi è la presenza del diabete, nella funzione dello strato delle mucine, è anche la loro concentrazione . Nel diabete, al contrario di altre malattie autoimmuni, c'è un notevole aumento di questa frazione proteica , e questo aumento è presente anche nel cancro orale e laringeo. Una spiegazione, perché il diabete, a differenza di altre malattie autoimmuni, può trovare una correlazione con il I risultati osservati nel nostro studio e con gli studi epidemiologici citati, può, essere ottenuta assumendo un

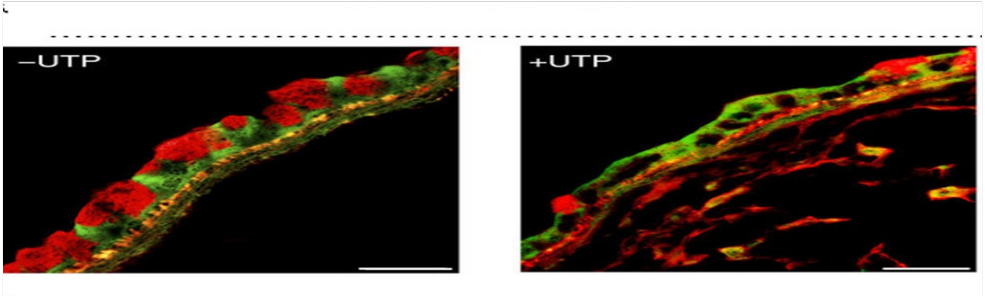
meccanismo attualmente non sperimentale verificato, sulla base del quale si ha la formazione, in presenza di diabete, di uno strato di mucine, MUC5 B e MUC7, ancora meno efficace Infatti, nel diabete aumenta notevolmente la concentrazione nella saliva del tipo di mucine secrete, MUC5B e MUC7, ma non il MUC1, legato alle cellule epiteliali e che assicura l'ancoraggio dello strato protettivo alla mucosa orale . Si può ragionevolmente supporre che questo aumento della frazione secreta sia eccessivo rispetto a quello della frazione MUC1, e ciò comporta una reciproca interazione ,tra le strutture polisaccaride terminali di MUC5B e MUC7, con formazioni di legame a ponte ddi idrogeno, tra i terminali di acido sialico salivare. La concentrazione di acido sialico libero ,quindi, nel diabete,dovrebbe essere è molto più bassa delle concentrazioni normali (71), perché legato , facilmente in questa struttura mucinica, rendendola ancora più compatta, anche perché altamente idratata. In realtà ,questo è ciò che le analisi chimiche confermano,e con esse anche questa situazione di sovra espressione nella formazione di mucine, In particolare, in questo modo si può supporre ,che MUC5B e MUC 7, contribuiscono a una compattazione, del tipo a bolla,che lascia tra le stesse bolle ,ampi spazi di discontinuità nel layer protettivo. Si può supporre che la saliva sia presente nel diabete, non come strato rilassato e aderente alla mucosa orale e / o alla laringe, ma come strato formato da molte gocce. Nelle figure 11 si propone una rappresentazione didattica della normale struttura protettiva dello strato della cavità orale e della laringe, come può anche essere mostrato tramite microscopio elettronico (foto 7)

Figura 11 NORMAL ORO-LARYNGEAL LAYER



P

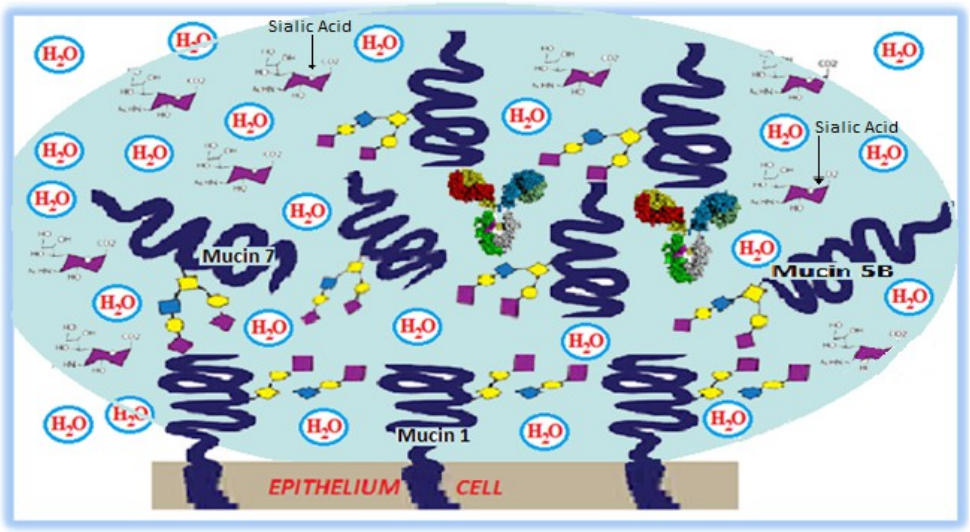
hoto 7 –The Mucous Layer In Fluorescence



Nel diabete, lo strato di mucina che dovrebbe proteggere l'epitelio, così come abbiamo ipotizzato, diventa un assemblaggio strutturale che assume l'aspetto non dell'epitelio stratificato. Per l'elevata concentrazione di mucine, e di conseguenza per un effetto molto alto di solvazione dell'acqua, e del suo assorbimento,assume la conformazione a bolla. Una rappresentazione ipotetica è mostrata nella figura 12, dove la differenza più evidente è la formazione di complessi, non più

stratificati regolarmente sull'epitelio orale e laringeo e quindi meno efficaci nei suoi protettivi

FIGURA 12- la struttura Ipotetica del layer in diabete



Abbiamo visto e dimostrato con sufficiente affidabilità perché ci possano essere quattro ragioni distinte, per cui le malattie autoimmuni e soprattutto il diabete, possono alterare lo strato di mucina che protegge la cavità orale. Per la diminuzione dell'efficacia di tale struttura protettiva, altri fattori, possono entrare in contatto diretto con epitelio orale e laringeo, diffondendosi nelle sue cellule,come i prodotti cancerogeni contenuti nel fumo , e / o virus oncogenici,tutti elementi , in grado di promuovere mutazioni genetiche . Queste considerazioni possono giustificare l'ipotesi derivata da dati epidemiologici e gli studi relativi, per i quali potrebbe esserci una correlazione tra il diabete, e il cancro orale / o il cancro laringeo. I risultati di questo studio sono molto interessanti,

perché, forse possono spiegano l'alta incidenza del cancro laringeo in paesi come Cuba e Iraq, dove in presenza di un basso consumo di alcol e tabacco c'è un grande problema di salute pubblica per il diabete

7-6-SESSO E CANCRO ORO-LARINGEO

Il meccanismo di come gli ormoni sessuali influenzano il rischio di cancro è probabilmente in gran parte determinando dal numero e dalla velocità ,delle mitosi,delle cellule epiteliali ,dell'organo in questione. Un alto tasso mitotico può aumentare il rischio di cancro, aumentando la probabilità di mutazioni che si verificano e si replicano prima di essere riparate, e possono anche aumentare la probabilità di crescita di tumori precoci. Nel caso dell'estrogeno, si è anche sostenuto che alcuni metaboliti dell'estradiolo possono causare mutazioni danneggiando direttamente il DNA, ma questo meccanismo non stato ancora del tutto chiarito,e si pensa che il ruolo principale degli ormoni sessuali nel cancro è probabilmente legato al tasso di crescita cellulare , e cioè alla velocità mitotica. L'androgeno, l'estrogeno e il progesterone, che agiscono attraverso recettori specifici, svolgono un ruolo importante nella crescita e nello sviluppo di diversi cancri, tra cui il seno, l'endometrio, la prostata e il cancro orale. I recettori degli ormoni sessuali nel tessuto vocale ,sono pasati da mera teoria,ad un riscontro più che fondato ,e con esso sull'influenza degli ormoni sessuali nelle patologie laringee.

RUOLO DI ESTROGENI E PROGESTERONE

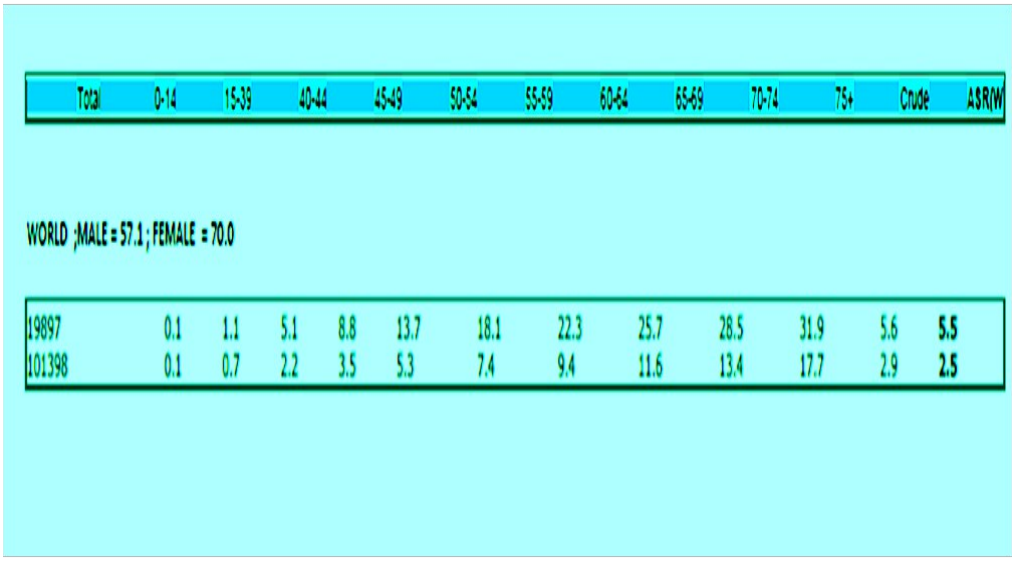
Studi su una grande serie di pazienti con HNC hanno dimostrato che i livelli di estrogeni nelle femmine svolgono un ruolo

protettivo nello sviluppo del cancro. Poiché i maschi hanno un livello minore di estrogeni, sono più predisposti a sviluppare il cancro, inoltre, la distruzione della funzione epatica in alcolisti porta ad alterazioni nel metabolismo degli ormoni sessuali (estrogeni e testosterone),e ciò è in diretto collegamento con l'aumento dei tumori.. Quindi, i maschi alcolisti hanno un rischio più elevato di sviluppare il cancro rispetto ai non alcolisti,così che ,un gran numero di pazienti con HNC sono maschi, caratterizzati da un ambiente endocrino, ricco di ormoni sessuali e di di testosterone. È stata dimostrata la presenza di estrogeni e recettori di progesterone nei tumori della cavità orale, della laringe o dell'ipofaringeo a livello di micro RNA(miRNA), e dei livelli di proteine seriche e salivari . I pazienti con abuso di alcool ,e con malattia cronica del fegato hanno alterato il metabolismo degli ormoni sessuali che coinvolgono testosterone e estrogeno e sono osservati a rischio di HNC, (72) . Essi hanno dimostrato un'espressione variabile di miRNA, di recettori degli androgeni (AR) e del recettore-alfa (ER-α),nonché degli estrogeni, nei tessuti maligni della mucosa orale e suggeriscono un'interferenza di questi ormoni sessuali in HNC. Diversi prodotti finali di estrogeni hanno dimostrato di avere effetti genotossici, mutageni, trasformati e cancerogeni. E' stato dimostrato anche , che un certo numero di geni del metabolismo estrogeno risiedono sulle cellule derivate da HNC. Un altro gruppo di studio, (73), ha indicato che l'alterato metabolismo degli estrogeni nel tessuto polmonare a seguito dell'esposizione al fumo di tabacco può portare allo sviluppo di tumori del tratto digerente aereo. Quindi, l'estrogeno può essere considerato uno dei fattori imperativi responsabili dello sviluppo di HNC.

RUOLO DI ALTRI ORMONI

Recentemente, (74),è stato osservato, che elevati livelli di prolattina in HNC possono essere un indicatore di prognosi infausta.,mentre altri studi , (75) hanno anche dimostrato un aumento dei livelli di ormone follicolare stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH) e prolattina e diminuito rapporto di testosterone, e estradiolo nei pazienti con tumore della lingua. Queste fluttuazioni ormonali indicavano chiaramente una perturbazione nell'asse pituitario-surrenale-testicolare: di conseguenza, si suggerisce che questi ormoni potrebbero svolgere un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione del cancro orale. Per spiegare questo possibile, se non il possibile effetto, abbiamo riportato sotto i tassi di incidenza di ASR del cancro orale nel mondo.

TABELLA 10 La variazione dell'indice ASR con l'età in WORLD



Total	0-14	15-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75+	Crude	ASR(W

WORLD ;MALE = 57.1 ; FEMALE = 70.0

19897	0.1	1.1	5.1	8.8	13.7	18.1	22.3	25.7	28.5	31.9	5.6	**5.5**
101398	0.1	0.7	2.2	3.5	5.3	7.4	9.4	11.6	13.4	17.7	2.9	**2.5**

Dalla tabella è possibile evidenziare almeno due dati rilevanti:

A) l'indice ASR ,per i maschi è costantemente crescente

B) la variazione dell'ASR tra i 45 ei 59 anni è molto più elevato nelle femmine e nella pratica, in relazione ai dati complessivi mondiali ,(vedi tavole 10,11) , questo indice , cresce di 1,5 volte di più,rispetto ai maschi.

Abbiamo analizzato statisticamente gli indici ASR in questo gruppo di età per l'intera popolazione mondiale ,e anche per il continente africano, per l'Ungheria e l'India, calcolando il valore della pendenza dell'indice ASR ,in funzione dell'età. Questi calcoli statistici restituiscono la pendenza della linea di regressione lineare attraverso i valori in-y e -x. Il valore statistico della pendenza ,indica la distanza verticale divisa per la distanza orizzontale tra i due valori sulla linea retta, ovvero il grado di variazione lungo la linea di regressione. Come si può vedere dai

risultati riportati nella tabella 11 , i valori nelle femmine, nella fascia di età, prese in considerazione,è molto più elevato, e ciò significa che per lo stesso range,, c'è una correlazione rispetto all'età molto meno lineare rispetto ai maschi. Possono essere anche impiegati metodi statistici “ Calcolatori di dimensioni di effetto”: in termini semplici, una misura della dimensione dell'effetto fornisce una misura standardizzata della forza o della grandezza di un effetto. Un test di significatività statistica ci dice quanto siamo sicuri che possiamo avere un effetto. Una misura della dimensione dell'effetto, come D di Cohen, ci dà un modo standardizzato per valutare la grandezza dell'effetto. In pratica, è probabile che si calcola sempre una dimensione dell'effetto se si sa già che l'effetto è statisticamente significativo (perché non è possibile calcolare la dimensione di un effetto, se non vi è alcun motivo per supporre che esista un effetto) ,e il modo particolare di calcolare ,se la dimensione di effetto è correlato al test di significatività eseguito. . Per calcolare una dimensione degli effetti, devi conoscere i mezzi e le deviazioni standard dei gruppi. Se si ha dati grezzi, si puo calcolare i mezzi e le deviazioni standard. Per il singolo campione Z-test, Cohen è calcolato sottraendo la media della popolazione (prima del trattamento, o dell’evento,in questo caso la menopausa) dalla media del campione (dopo il trattamento) e quindi dividendo il risultato per la deviazione standard della popolazione

TABLE 11 : ASR INDEX FOR AGE

	HUNGARY		WORLD		AFRICA		INDIA	
AGE	ASR	ASR	ASR					

	MEN	WOMEN	MEN	WOMEN	MEN	WOMEN	MEN	WOMEN
44	20	4	5	2	3	2	10	4
49	34	9	9	4	5	3	17	8
54	52	14	14	5	7	4	26	10
59	61	18	18	8	10	5	35	15
64	69	21	23	10	12	8	41	17
PENDENCE	0.39	1.15	1.11	2.45	2,10	3.33	0.62	1.31
Cohen's d	5.926	2.57053	0.44	0.117	0-67	0.26	1.64	1.11

Non ci sono però , evidenze epidemiologiche o metanalisi,che , riferiscono la differenza nella più alta incidenza del cancro laringeo nei maschi,relative i fattori ormonali .Addirittura In un recente studio i dati mostrano che i recettori degli ormoni sessuali sono assenti nelle corde vocali (76) Altre teorie devono essere considerate per spiegare il fatto che gli ormoni influenzano la qualità della voce. Questo studio discute la possibilità che i cambiamenti di voce secondo il sesso e per tutta la vita possano essere legati ad una diversa espressione di alcuni fattori di crescita nel tessuto laringeo e che questa espressione potrebbe a sua volta essere influenzata da variazioni ormonali

8 - INDICAZIONI - PROSPETTIVE - CONCLUSIONI

In tutti i vari capitoli,precedentemente esposti, sono riportati gli argomenti, che tendono a dimostrare come l'eziologia del cancro

orale e laringeo, è multifattoriale. Il cancro orale sembra dipendere molto, almeno in una grande in particolari aree geografiche, da fattori ambientali o alimentari (betel). Per tutti i tipi di tumori, sia per la cavità orale che per la laringe, possono essere individuati sei principali fattori di rischio: sesso, fumo, età, diabete, comportamenti alimentari, HPV e predisposizione genetica, con le relative principali mutazioni genetiche ,illustrate in figura 12. In tutti i casi, e 'possibile ipotizzare che qualunque sia la mutazione genetica che innesca l'evento tumorale, nella maggior parte dei casi è reso possibile da un' indebolimento dello strato protettivo del layer mucinico , successivo a sua volta ad una alterazione quali-quantitativa delle mucine In base a quanto sopra esposto può essere considerato un valido ,un " metodo di analisi " riassunto nel foglio di flusso «genetico», (vedi figura 13). Per l'analisi del rischio, nella rappresentazione cellulare, vengono presentati, all'interno della stessa, i geni, più suscettibili di alterazione: Il foglio di flusso, sotto rappresentato, ha come target finale gli stessi geni, con un processo a cascata dove i fattori di rischio, promuovono le possibili conseguenze patofisiologiche.

FIGURA 12, le mutazioni genetiche più importanti nel cancro orale e laringeo

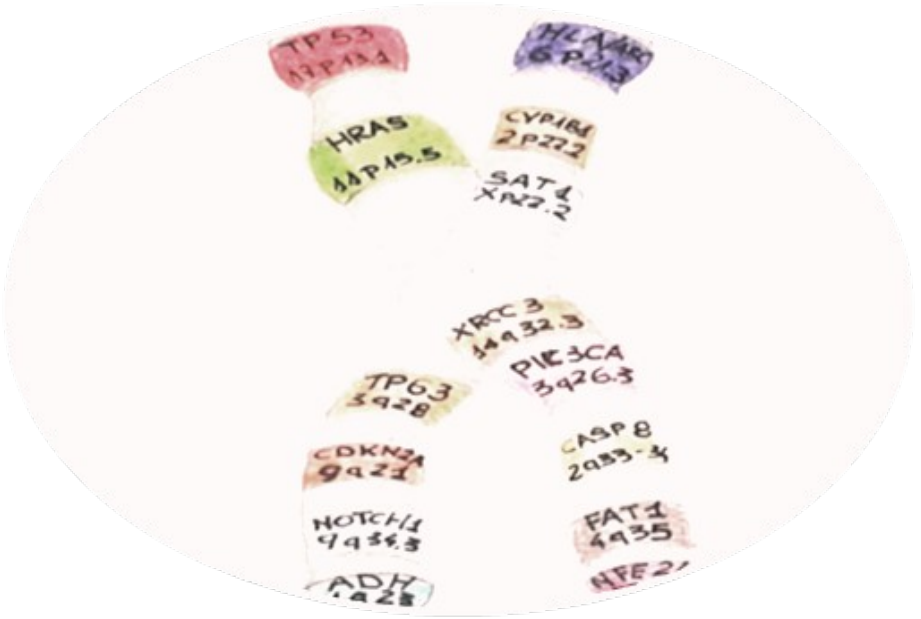


FIGURE 13 hypothetical flow sheet for the promotion of the cancer and his consequence

ANALISI DEI RISCHI E I MARCATORI DELLA CANCEROGENESI

I marcatori tumorali classici (77) nella pratica clinica sono principalmente proteine :(CEA, CA 19-9, CA 125 ecc.), e sono particolarmente importanti per seguire la risposta del paziente ai trattamenti farmacologi,nonché per una diagnosi precoce delle recidive. Queste molecole vengono utilizzate nella diagnosi iniziale (di solito in combinazione con tecniche di imaging); è un'eccezione il CA125,marker nel cancro ovarico, che è specifico solo per questo particolare tipo di cancro. La comparsa

ed il rilevamento delle cellule tumorali circolanti (CTC) nel sangue è un fatto non particolarmente frequente ed è un'indicazione di probabili metastasi. Inoltre, nella maggior parte dei tipi di tumori, il loro numero riflette la sua stadiazione: i tumori nelle prime fasi,e con una limitata capacità metastatica hanno generalmente un basso numero di cellule tumorali circolanti. Cellule tumorali circolanti ,contenenti DNA intatti, o RNA e proteine , probabilmente rappresentano cloni che produrranno tumori con potenziale metastatico. Questi tipi di cellule, hanno un potenziale diagnostico significativo, almeno nella malattia avanzata. All'interno delle varie esperienze,per l'utilizzo di markers a base di CT- DNA vi 'è una letteratura considerevole che dimostra che le mutazioni, comprese quelle di rilevanza per la scelta del trattamento, possono essere identificate con alta sensibilità e specificità, ,con questo tipo di ricerca ,ed essa include anche la ricerca di fusioni di geni, mentre le modifiche in numero diverso di copie sono più difficili da valutare. I livelli di CT-DNA riflettono generalmente il potenziale tumorale e aumentarli possono essere anche in stadi di pre-malignità: i mi RNA forniscono risultati promettenti per la rilevazione del cancro, anche se la loro capacità di predire la risposta alla terapia, fino ad oggi, è incerta.

• In contrasto con la CT, il mi-RNA-DNA è spesso considerato molto instabile e difficile da sequenziare.

• a) per quanto riguarda le considerazioni di cui sopra, alcuni gruppi di studio (cancro al seno) hanno invece dimostrato che i loro livelli nel plasma e nel siero hanno una buona sensibilità e specificità per la diagnosi del cancro.

• b) mi RNA da esosomi (vescicole extracellulari), da plasma e ctc possono essere utilizzati per sequenziare RNA, consentire di identificare i geni di fusione mediante RNA AND DNA.

• c) mi RNA da leucociti di sangue permettono di identificare reazioni immunologiche al cancro e possono avere una grande importanza futura, in particolare per i pazienti trattati con immunoterapia (ad esempio, anti-CTLA4).

Particolare interesse è stato lo sviluppo della nuova tecnologia di rilascio elettromagnetico EFIRM (78), che sembra avere maggiori probabilità di individuare mutazioni del gene singolo quando il tumore è nelle prime fasi. La prova è basata su una nuova tecnologia che rileva Molto Rapidamente all'interno delle "ESOSOMI", mutazioni genetiche; Ha trovato un'applicazione eccellente e riproducibile per l'identificazione e il dosaggio del gene che codifica il fattore di crescita epidermico (EGFR), una proteina della superficie cellulare che normalmente in condizioni fisiologiche aumenta e divide normalmente le cellule. Nel carcinoma polmonare non a piccole cellule c'è un eccesso di EGFR, che li rende più rapidi. Diversi farmaci possono bloccare il segnale di crescita da EGFR e l'identificazione della mutazione consentirebbe un inizio precoce della terapia. Secondo Wong, la prova della saliva potrebbe consentire uno screening per una varietà di tumori, inclusi quelli della cavità orale

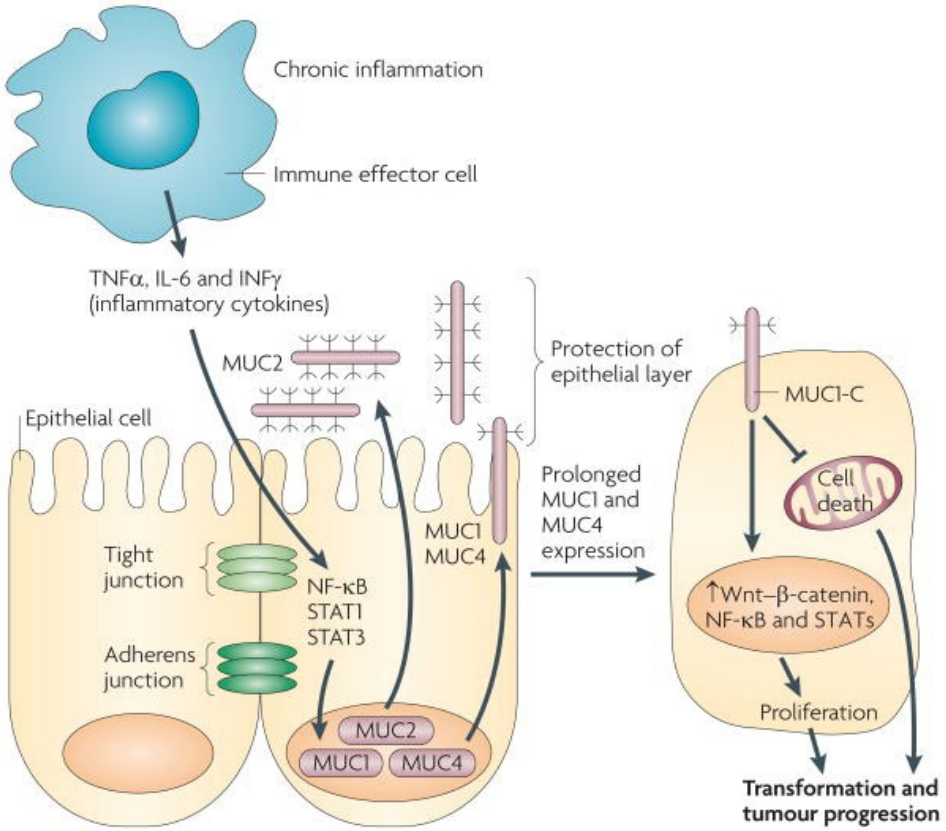
PROSPETTIVE DAL STUDIO SUL MECCANISMO DEGLI ALTERAZIONI MUCINS

Il gene della famiglia mucinica umana codifica fino a 20 proteine note, che possono essere divise in forme secrete e associate alla

membrana ciascuna con una struttura tipica del dominio proteico. Le mucine secrete sono adattate al collegamento trasversale al fine di consentire la formazione delle reti di mucina estese trovate nei gel di muco secreto. Le mucine associate alla membrana dispongono di domini specifici di membrana che consentono le loro varie funzioni biologiche come parte del calice glicolico. Tutte le mucine sono altamente glicosilate e questo è specifico del tessuto e legato a funzioni biologiche specifiche in questi luoghi. La biologia della mucina è dinamica e i processi di degradazione e turnover sono ben integrati con la biosintesi per mantenere una protezione continua delle mucose contro tutte le forze aggressive esterne, come per esempio l'interazione delle mucine con la micro flora. Le mucine sono modificate in una varietà di malattie e questo può essere dovuto a peptide mucino aberrante o glicosilazione. Le mucine di membrana secreto e trans che costituiscono la barriera mucosa sono in gran parte non riconosciute come efficaci di carcinogenesi. Tuttavia, entrambi i tipi di mucine sono intimamente coinvolti nell'infiammazione e nel cancro. Inoltre, molte malignità umane hanno un'eccessiva espressione delle mucine trans membrana per sfruttare il loro ruolo nella segnalazione della crescita cellulare e della sopravvivenza. Le mucine sono state così identificate come marcatori di prognosi avversa e come attraenti target terapeutici. In particolare, le conclusioni che determinate mucine trans membrana inducono la trasformazione e promuovono la progressione tumorale hanno fornito la base sperimentale per dimostrare che gli inibitori della loro funzione sono efficaci come agenti antitumorali nei modelli preclinici. Ad esempio, MUC1 è aberrantmente espressa in ~ 900.000 dei 1.4 milioni di tumori (carcinomi e certe malattie

ematologiche), diagnosticate ogni anno negli Stati Uniti, rendendo MUC1 l'espressione di una delle alterazioni più comuni nei tumori umani. L'espressione eccessiva di MUC1 può essere parzialmente attribuita all'amplificazione del loco MUC1 e / oa loop auto-induttivi che coinvolgono l'attivazione del promotore MUC1 attraverso NF-κB e altri fattori di trascrizione che sono effetti della risposta infiammatoria (come sopra discusso) . Come è stato recentemente riesaminato e riassunto qui di seguito, gran parte del lavoro più recente sul MUC1 si è concentrato sulla subunità MUC1-C e su come funziona come proteina onco

Figure 14 The schematic process of the alteration of the functions of MUC1



Un altro esempio è il fatto che Mucin-7, membro della famiglia dei mucine, potrebbe svolgere un ruolo cruciale durante lo sviluppo del tumore e la sua espressione aberrante è stata osservata in diversi tipi di tumore

Mucine nella diagnosi del cancro e MUC1 come esempio di possibile applicazione

I primi lavori dimostrando che MUC1 è aberrantmente sopra espresso nei carcinomi umani del seno, () ha portato alla constatazione che la subunità MUC1-N è rilevabile a livelli più elevati nel siero dei pazienti con cancro al seno. La misurazione dei livelli di MUC1-N circolanti, come determinata dal test CA15-3 approvato dalla US Food and Drug Administration, è stato utilizzato per monitorare il corso clinico di pazienti affetti da tumore al seno durante il trattamento e per rilevare la recidiva delle malattie precoci . Numerosi studi hanno esaminato l'espressione di MUC1-N come marker nei tumori della mammella e indicano che la localizzazione aberrante alle membrane non apicale e il citosolo conferisce una prognosi peggiore. La profilazione dell'espressione genica dei tumori della prostata umana ha anche dimostrato che la MUC1 è regolata in sottogruppi con un rischio aumentato di recidiva. Come ulteriore evidenza, l'ibridazione genomica comparativa e le analisi microarray di ct DNA dei tumori della tiroide papillare identificarono MUC1 come marcatore indipendente del comportamento aggressivo e della scarsa sopravvivenza. In sintesi, l'espressione MUC1 conferisce una prognosi scarsa in diversi tipi di carcinomi. L'espressione eccessiva di mucina trans-membrana altamente glicosilata, in particolare nel cancro orale e laringeo può fornire anche importanti elementi per una diagnosi precoce preliminare. In effetti la ricerca mostra un aumento, nella cavità orale e tumori laringe dell'attività di alcuni enzimi , Come la sialoinidasi, un aumento dell'acido sialico libero, considerato uno dei marcatori più affidabili, (77), si veda la tabella 12.

TABLE 12 Markers In Oral and Laryngeal Cancer

		Sensitivity	*Specificity*	*AUC*
$Beta_2$-microgobulin	Saliva	90%	90%	0.945
	Blood	100%	100%	1.00
MDA	Saliva	87.6%	100%	0.927
	Blood	73.3%	90%	0.852
Sialic Acid	Saliva	100%	100%	1.00
	Blood	93.3%	100%	0.983
Catalase	Saliva	86.7%	70%	0.765
	Blood	100%	100%	1.00
SOD	Saliva	100%	100%	1.00
	Blood	93.3%	70%	0.858
GSH	Saliva	100%	100%	1.00
	Blood	100%	100%	1.00
Neuraminidase	Saliva	83.3%	80%	0.800
	Blood	63.3%	100%	0.737

MAGGIORI CONCLUSIONI :

A) frazioni di mucine secreto e trans membrana rappresentano una famiglia di glicoproteina che ha ruoli fondamentali nella protezione della mucosa e nella comunicazione con l'ambiente esterno. (80).

B) l'espressione iper, specialmente delle mucine trans membrana, può indicare scarse prognosi del cancro

C) -. L'eccessiva espressione delle mucine è un buon indicatore e / o marker biologico, o in caso di carcinogenesi: infatti, sembra avere un equilibrio dinamico nella produzione e nel fatturato delle stesse mucine; Paradossalmente, si possono avere diverse situazioni biologiche, minore, o una maggiore concentrazione di frazioni muciniche, indicatore dello stesso RISCHIO

:

PROPOSTE PER IL TRATTAMENTO DELLA CANCER -

• A - PURIFICAZIONE DELL'ESTRAZIONE - ATTIVAZIONE NEURAMINIDASE IN SITO SANGUE E IN TERRA, PER ATTACCHIRE IN RIFERIMENTO A MECCANISMO DI DECRETO-ANGOGENESI

• B-GENETICA DI UN VIRUS ONCOGENICO (HPV 6,11), con Tp53 e CDKN2A

• C-INFEZIONE DELLA CANCRO DELLA CELLULE

Fase A La neuraminidasi sulla superficie del virus dell'influenza A, elimina gli acidi sialici dai glicani delle cellule prima che questi possano essere infetti. L'inibizione della NA con oseltamivir, infatti, sopprime sia l'infezione virale, sia il rilascio del virus stesso dalle cellule epiteliali del tratto respiratorio umano nella cultura. Nella fase infettiva, le cellule epiteliali infatti producono una grande quantità di muco con un'alta presenza di acido sialico che produce una barriera difensiva, tuttavia, distrutta dalla sialidasi presente sul virus. Questi virus, però, non possono essere utilizzati, perché non hanno trasformazioni .activities

Passo B - uso della Neuroaminidasi purificata, nel sangue

Fase C Ingegneria di un virus trasformante, oncogeno molto basso e benigno (HPV 6,11), con Tp53 e / o CDKN2A

CONCLUSIONI FINALI

Ci sono prove fornite dai dati epidemiologici, da quelli forniti dalla letteratura più recente, dagli esperimenti dei ricercatori e

dalle considerazioni che sono state fatte finora sul ruolo dei geni ,che i fattori ambientali possono essere considerati veri promotori del processo cancerogeno . È chiaro che qualsiasi cancerogeno chimico o fisico presente negli alimenti , nel fumo ,nei farmaci etc ,è in contatto immediato con un epitelio oro-faringeo-laringeo,praticamente scoperto e in queste condizioni può promuovere il cancro. Questa considerazione si applica anche al virus HPV, che, statisticamente, alligna quasi esclusivamente nei punti anatomici più depauperati della protezione delle mucine, come le tonsille palatine e linguali.

- Le alterazioni nella formazione delle mucine e/o del layer corrispondente,possono essere intra e /o extra cellulari

Le alterazioni intracellulari più evidenti sono dovute a cambiamenti ancora non ben definiti e relative a patologie come la sindrome di Sjogren, ma sono di scarsa significatività, per la promozione della cavità orale e della laringe. Più importanti sono quelle dovute all'azione di fattori esogeni e / o endogeni, episodici o cronici

In ogni caso, dovrebbero essere monitorati i cambiamenti cronici ,che comportino modificazioni delle proprietà chimico-fisiche dell'intera saliva, ad esempio,il pH ,ed il sistema tampone , in particolare le condizioni che portano a valori di alta acidità,del cavo orale

È pertanto necessario,in una operazione di monitoraggio o screening preventivo, procedere con un protocollo che preveda:

1-analisi della letteratura e verifica dell'effetto reale dei fattori di rischio sull'equilibrio fisico e biologico delle mucine salivari.

2-assegnazione di un punteggio ,indice di pericolo e dipendenza, dei vari fattori di rischio.

3-formulazione di un questionario da proporre a una popolazione sana come quello da noi ,già sottoposto ai pazienti laringectomizzati

4 - analisi statistica dei risultati e loro validazione

REFERENCES

1 Menicagli, R., Duca, M., Rancoita, P. M. V. and Arizzi, C The influence of the mucins in genetic balance in oral and laryngeal cancer and by their biochemical behaviour a working hypothesis for their careInternational Journal of Current Research Vol. 8, Issue, 04, pp. 29800-29806, April, 2016

2- http/7:www.nature.com . Oral cancer - Latest research and news; *23 February 2016*

3- IARC.GLOBOCAN 2012

4--http//: wwwlinkiesta.it 2013

5- WHO. 2008 ,Second report on smoking

6- Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku. Evaluation of secretory mucin concentration of patients with squamous cell carcinoma oral cavit · Vol. 50, 2005 · Annales Academiae Medicae Bialostocens

7-Erica Shapiro Frenkel,Katharina Rubbeck .salivary mucins in host defenses and diseases prevention.Oral Microbiol.2015 ;7:10

8-Zalewska A,et al .human salivary mucins acta Biochim Pol 2000;47(4),1067-79

9-Menicagli R,Duca M,rancoita PM .;particula food habits in oral and laryngeal cancer promotion frontiera ORL vol IV,2014 ,

10- Gibbins Hl ,et al Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle; Oral diseases .,2014,Oct,20(7),707-13

.11 – Hannah L et al. What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? Colloids Surf Biointerfaces 2014,aug 1:120(100);194-192

12- Lindh L[1]. On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. Swed-dent.J.Suppl 2002;(152),1-57

13- Hannah ,et al . SIgA Binding to Mucosal Surfaces Is Mediated by Mucin-Mucin Interactions Plose One ,2015; 10(3): e0119677

.14-Céline Portal,'et al ; *In vivo* imaging of the Muc5b gel-forming mucin; Sci Rep. 2017 Mar 15;7:44591

15- Shirffman M ,et al .Carcinogenic human papilloma virus infection . (2016),Nature review article 18086

16-Human Papillomavirus and Related Diseases Report IRAQ Version posted on www.hpvcentre.net in February 26th, 2016 ; The development of this report has been supported by grants from the European Comission (7th Framework Programme grant HEALTH-F3-2010-242061, HEALTH-F2-2011-282562, HPV AHEAD)

17-Gama RR1, et al. 2015. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. Laryngoscope., nov 6. -15-22

18-Laprise C, et al. No role for human papillomavirus infection in oral cancers in a region in southern. India. Int J Cancer, 2015 aug 28. Pp 123-125

20 - Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F,

Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. Tobacco smoke and cancer: recent epidemiological evidence. J. Natl. Cancer Inst. 2004;96:99–105

21) Peto R, Lopez AD. Future worldwide health effects of current smoking patterns. In: Koop CE, Pearson CE, Schwartz MR, editors. Critical Issues in Global Health. Jossey-Bass; San Francisco, CA, USA: 2001. pp. 150–167.

22-Hoffman D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950–1995. J. Toxicol. Environ. Health. 1997;50:307–364.

23- Zaga v,Gattavecchiae.2002.Radicali liberi e fumo di sigaretta.Gior It Mal Tor,56,5,pp375-391

24- Taniguchi M,et al Multimolecular salivary mucin complex is altered in saliva of cigarette smokers: detection of disulfide bridges by Raman spectroscopy .Biomed Res Int 2013;2013:168765.

25- Demirtas M,Senel U,Yuksel S,Yuksel M. 2014 A comparision of the generation of free radicals in saliva of activeand passive smokers.Turk.J.Med.Sci: 44(2) :208-11

26-Menicagli ,et al ,2017,In Press Frontiera ORL 2017

27- Gonzalez-Freire M,de Cabo R,Bernier M, Soliott S J,Fabbri E,Navas P,Ferrucci L.2015;Reconsidering the role ofmitochondria in aging.J Gerontol A Biol Sci Med Sci ;May 20

28) Short KR, Bigelow ML Kahl J et al.Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(15):5618–5623.*

29-. Denny PC, Denny PA, Klauser DK, Hong SH, Navazesh M, Tabak LA. Age related changes in from human whole saliva. J Dent Res 1991;70:1320-7.

30-. Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. Protein modification in aging. *EXS*. 1992;62:64–72.

31- Di Joseph Z. Zaretsky ,Daniel H. Wres. Mucins – Potential Regulators of Cell Functions Volume I ,2011 ; Bentha Science Publishers

32-Addiction Biology (2002) 7, 77±83 ARECA NUT SYMPOSIUM Global epidemiology of areca nut usage P. C. GUPTA & S. WARNAKULASURIY

33-Boucher BJ ,Mannan N Metabolic effects of the consumption of Areca catechu Addiction Biol . 2002 Jan;7(1):103-10.

34- Rajeshwar N ,et al;. Association of Betel Nut with Carcinogenesis: Revisit with a Clinical Perspective Plos One ; 2012; 7(8): 42759.

. 35 -Guha N[1], Warnakulasuriya S, Vlaanderen J, Straif K Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control..Int J Cancer. 2014 Sep 15;135(6):1433-43. .

36- ,Lane H Y ,et al .Betel-quid dependence domains and syndrome associated with betel-quid ingredients among chewers: an Asian multi-country evidence Addiction 2014 Jul;109(7):1194-204.

37-Chi Pang Wen, Po Jung Lu and Min Kuang Tsai, Epidemiology of Oral Cancer in Taiwan and its Policy Implications: An Urgent Call for Attention to the International Community to Offer Assistance (pp. 1-20); https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?.

38- IARC MONOGRAPH , 1985, 1987, 2004).

39-39-Narukawa, M., Kimata, H., Noga, C., and Watanabe, T. (2010). Taste characterisation of green tea catechins. International journal of food science & technology *45*, 1579-1585

40-Cala, O., Dufourc, E.J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., and Pianet, I. (2012). The Colloidal State of Tannins Impacts the Nature of Their Interaction with Proteins: The Case of Salivary Proline-Rich Protein/Procyanidins Binding. Langmuir *28*, 17410-

41-Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J., Haslam, E., Davies, A.P., and Williamson, M.P. (2002a). Polyphenol/peptide binding and precipitation. Journal of Agricultural and Food Chemistry *50*, 1593-1601.

42-Charlton, A.J., Haslam, E., and Williamson, M.P. (2002b). Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time-averaged nuclear Overhauser effects. Journal of the American Chemical Society *124*, 9899

43- Hearthr S Davies ,et al . Reorganisation of the Salivary Mucin Network by Dietary Components: Insights from Green Tea Polyphenols. PLos One . 2014; 9(9): 10837

44-Fu J Y,Gao J,Zhang Z Y,et consumption and the risk of oral cancer incidence: a case-control study from China .oral Oncol .,2013 Sep;49(9):918-22.

45- Park J.Kim S.Moon B..Changes in carotenoids ,ascorbic acid and quality characteristics by the picking of paprika cultivated in Korea . J Food Sci. 2011 Sep;76(7):C1075-80.

46-Jeong W,Y,et al. Determination of polyphenols in three Capsicum Anuum , (bell pepper) varietes using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: their contribution to overall antioxidant and anticancer activity .J Sep Sci,2011.Nov;34(21):2967-74.

47-Mokhtar M ,et al . Determination of the polyphenolic content of a Capsicum annuum L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity.J Sep Sci 2015 Jan;38(2):171-8.

48-Suba Z,Mihalvi S,takacs D,Gyulai-Gaal S ,2009. Oral cancer: morbus Hungaricus in the 21st century.Fogory Sz . 2009 Apr;102(2):63-

49-Lin HY ,Muller YA,Hammond GL .(2010) Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. Mol Cell Endocrinol Mar 5;316(1):3-12.

50 –Guardill BR ,Vogl MR,Lin Hy ,et al . 2012) Corticosteroid-binding globulin: structure-function implications from species differences. PLose One. 7(12):e52759..

.51 –Yasuha Hori-Tanaka ,Kev Yura . Structural classification of steroid-binding sites on proteins by coarse-grained atomic environment and its correlation with their biological function Mol Cell Endocrinol , 2010 Mar 5;316(1):3-12

52 –Avvakumov GV ,(1995). Structure and function of corticosteroid-binding globulin: role of carbohydrates. J Steroid Biochem Mol Biol . Jun;53(1-6):515-22.

53-Ali S, Basset J R(1995). Studies on the role of glycosylation in the origin of the electrophoretic variants for rat corticosteroid-binding globulin. Steroids . Nov;60(11):743-52.

54--Menicagli R ,Duca M Arizzi C,,Merit Journ. Resech, Vol. 4(2) pp. 127-132, February2016

55--9- Pontremoli C, Barbero N,Viscardi G,Visentin S,2015.Mucin-drugs interaction:the case of theophylline ,prednisolone and cephalexin. Biorg Med Chem,Oct 15,23(20):6581-6

56- Alcazar B ,et al . Effect of Inhaled Corticosteroids on Salival Composition: a Cross Sectional study in patients with bronchial asthma ,clinical drug investigation ;35(9);august 35(9) · August 2015

57- Menicagli Roberto Marotta Otensio; study in vitro of the effects of corticoxyteroid on the oral and laringeal mucosa,in press frontiera orl ,vol iii june 2017

58-LeeCH,Hyun MK ,Jang EJ,et al.Inhaled corticosteroid use and risks of lung cancer and laryngeal cancer..Respir Med 2013 Aug;107(8):1222-33

59-Coca-Pelaz A,et al ;Relationship between reflux and laryngeal cancer. ;Head Neck 2013 Dec;35(12):1814-8.

60-Kyung Tae ,et al. The Role of Laryngopharyngeal Reflux as a Risk Factor in Laryngeal Cancer: A Preliminary Report, Clin Exp Otorhinolaryngol, 2011 Jun; 4(2): 101–104.

61-Zhao Y,et al . Research on the association of the laryngeal carcinoma and laryngopharyngeal reflux. Zhonghua Er Bi yan Hou Tou Jing Wai ke Za Zhi 2014May,49(5):356-61

-62-Amrita Vijay Taichi Inui Michael Dodds, Gordon Proctor, Guy Carpenter. Factors That Influence the Extensional Rheological Property of Saliva; PLoS ONE 10(8): e0135792. -

63- Menicagli R ,et al . THE POSSIBLE ROLE OF THE DIABETES IN THE ETIOLOGY OF THE LARYNGEAL CANCER, 2017 Gulf J Oncolog..1-23 ,pp-44-51

64-Chaudhury N M,et al –Reduced Mucin -7(Muc 7), sialylation and alterd saliva rheology in sjongreen's syndrome associated oral dryness . Mol Cell ProMol Cell Proteomics. 2016 Mar;15(3):1048-5

65—Feres de Melo AR ,Ferreira de Souza A ,de oliveira Peretrelo B ,Leite MF. Clinical oral and salivary parameters of children with juvenile idiopathic arthritis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014 Jan;117(1):75-80..

.

66- Zalewska A ,Knas M,Waszkiewicz ,et al Rheumatoid arthritis patients with xerostomia have reduced production of key salivary constituents.Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol . 2013 Apr;115(4):483

67-J M Woof[1] . M W Russell.Structure and function relationships in IgA;Mucosal Immunology (2011) 4, 590–597

68-Kakoei S ,Hosseini B –Haghdoost AA,sanjari M ,et al .Evaluation of Salivary Secretory Immunoglobulin A Levels in Diabetic Patients and Association with Oral and Dental

Manifestations ;Sultan Qaboos Univ Med J . 2015 Nov;15(4):e507-11 23.

69—Branco-de-Almeida L S ,Lopes F F ,Pereira ade F,Guerra R N,et al ,; Salivary IgA : periodontal treatment needs in diabetic patients ;Braz Oral Res . 2011 Nov-Dec;25(6):550-5.

70-Eliasson L ,Birkhed D ,ostemberg T,Carlen A ,; Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and the elderly diabetes. ; Eur J Oral Sci 2006 Dec;114(6):494-9.

71-Belce A,Usla E,Kucur M ,et al..Evalution of salivary sialic levels and Cu-zn superoxide dismutaseactivity in type 1 diabetes mellitus,Tohoku J Exp Med 2000 ,192(3):219-25

72-Colella G,et al Expression of sexual hormones receptors in oral squamous cell carcinoma. Int J Immunopathol Pharmacol.Apr-Jun;24(2 Suppl):129-32

73- Bartosz Kazimiersz ,et al ,Exploring estrogenic activity in lung cancer.Mol Biol Rep 2017 -44(1);35-50

74-Wu T F,luo F J,chang YL,Huang CM ,et al The oncogenic role of androgen receptors in promoting the growth of oral squamous cell carcinoma cells. Oral Dis. 2015 Apr;21(3):320-7.

75-Purshotam Nainani,Aparna Paliwal,Neela nagpal ,and Mayank Agrawal Sex hormones in gender-specific risk for head and neck cancer: A review.J Int Soc Prev Community Dent

76- Nacci A ,et al, Sex hormone receptors in vocal fold tissue: a theory about the influence of sex hormones in the larynx..Folia Phoniatr Logop 2011;63(2):77-82.

77- Duca M ,Menicagli R. La prevenzione e lo screening dei tumori del cavo orale e della laringe: up date sulle attuali conoscenze : corso seminario milano 9 aprile 2017 ENT Specialization and Formation

78-Tu M ,Wei F ,Yang J,Wong D . Detection of exosomal biomarker by electric field-induced release and measurement (EFIRM). J Vis Exp .2015 Jan 23;(95):524-39

79-Xin wang ,fei jan ,Run Shi,et al . Hyper Expression of Mucin 5ac Indicates Poor Cancer Prognoses A Meta-Analysis 2016

80- Corfield AP Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection.Biochim Biophys Acta . 2015 Jan;1850(1):236-52