

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
Departamentul II – Morfologie microscopică/Histologie**

**RUMEL I. RAMONA-CAMELIA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**IMPACTUL PROFILULUI MOLECULAR ASUPRA  
TRATAMENTULUI ȘI PREVENȚIEI CANCERULUI  
ORAL**

**REZUMAT**

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. MARIUS RAICA**

**Timișoara  
2020**

Tumorile cavității orale și ale faringelui au o incidență cu trend crescător de la un an la altul. Detecția precoce a acestor patologii prin inițierea și implementarea unui program național de screening, care să se desfășoare la nivelul cabinetelor medicale dentare precum și ale medicilor de familie ar constitui un important pas în prevenția și depistarea precoce a diferitelor stări maligne și premaligne situate la nivelul cavității orale.

Cancerale orale sunt cancerale ale cavității orale, glandelor salivare, laringelui, faringelui și sunt denumite la modul general carcinoame cu celule scuamoase ale capului și gâtului (HNSCC). Acest cancer este al șaselea ca frecvență pentru sexul masculin din lumea dezvoltată, și al optulea ca frecvență în general la nivel mondial. Carcinomul scuamocelular reprezintă cea mai comună formă histopatologică de cancer al capului și gâtului, această formă reprezentând 90% dintre toate formele de cancer oral. Carcinoamele scuamocelulare ale capului și gâtului (HNSCC) reprezintă a cincea cauză de mortalitate la nivel mondial, determinată de boala neoplazică. În prezent singura metodă de screening cunoscută este examinarea vizuală pe care o fac medicii dentiști la vizitele pacienților sau de către medicii specialiști în otorinolaringologie.

Scopul sau *Obiectivul principal* al cercetării personale este analiza profilului molecular al celulelor tumorale, și identificarea unei metode de individualizare a tratamentului cancerului oral, dar și a unei metode de screening eficiente în depistarea precoce a cancerului oral.

O contribuție științifică pe care proiectul meu îl va aduce este o clasificare moleculară a cancerului oral, care să permită noi scheme terapeutice și propunerea unui algoritm de detecție precoce a acestei patologii, inclus într-un program de screening.

*Obiective specifice:*

- Caracterizarea imunohistochimică și moleculară a leziunilor premaligne și maligne scuamocelulare de la nivel oral;
- Evaluare multimodală a leziunilor premaligne și maligne de la nivelul cavității orale prin aplicarea de metode de diagnostic și de laborator specifice, urmată de corelarea rezultatelor obținute cu criteriile clinice, morfologice și, mai ales moleculare.
- Analiza comparativă a profilului molecular al celulelor scuamoase de la nivelul cavității orale și a salivei la pacienți cu cancer oral diagnosticat și la un grup de pacienți care au factori de risc pentru cancerul oral;
- Analiza de screening prin autofluorescență al pacienților care se prezintă la un cabinet de Stomatologie prin VELscope Vx.

Partea generală abordează date epidemiologice cunoscute ale cancerului de cap și gât, împreună cu clasificarea histopatologică și moleculară a acestuia. Microangiogeneza și mecanismele sale în dezvoltarea cancerului oral sunt de asemenea descrise cu ultimele noutăți în domeniu și implicarea podoplaninei în terapia cancerului oral.

*În partea specifică* am plecat cercetarea de la premisa că tumorile maligne ale cavității orale au incidența în continuă creștere, așa cum am arătat

în partea generală. Cea mai mare parte a acestor tumori sunt carcinoame scuamocelulare, depistate clinic în diferite faze de evoluție naturală. În ciuda eforturilor în planul diagnosticului precoce și a contribuțiilor terapiei adjuvante convenționale, prognosticul pe termen lung al acestor tumori rămâne nefavorabil, iar supraviețuirea și intervalul liber de boală nu s-au modificat semnificativ în ultimele două decade.

În ultima perioadă au fost evaluați numeroși markeri moleculari în sensul caracterizării unor noi markeri prognostici și în identificarea de noi ținte terapeutice. Această abordare a fost generată de observațiile clinice, care au raportat incidență diferită a recurențelor și durate diferite de supraviețuire pentru cazurile cu aceeași formă histopatologică și grad de diferențiere. Marea majoritate a acestor studii s-au axat numai pe caracteristicile moleculare ale celulelor tumorale și au luat mai puțin sau deloc în studiu micromediul, care este esențial pentru progresia locală, metastazarea limfonodală și sistemică. Poate că din acest motiv rezultatele obținute nu au fost convingătoare în ceea ce privește neoplazia scuamocelulară orală. Pe de altă parte, markerii care au fost demonstrați ca utili în experimente *in vitro* și *in vivo* nu au putut fi extrapolați la om, iar trialurile clinice bazate în special pe inhibitori ai receptorilor tirozin kinazici au fost dezamăgitoare.

Una dintre particularitățile progresiei și metastazării tumorale în general și a carcinoamelor scuamocelulare orale în special este formarea de noi vase sanguine și limfatice, care reprezintă suportul pentru progresia locală și la distanță a tumorii. Angiogeneza și limfangiogeneza sunt destul de puțin studiate în carcinoamele scuamocelulare orale și leziunile precursore, și în prezent există numeroase controverse legate de valoarea prognostică și existența unor ținte terapeutice reale în aceste leziuni. Astfel, este controversată valoarea prognostică a densității microvasculare, nu sunt studiate tipurile de vase asociate tumorii, este incertă valoarea terapeutică a expresiei VEGF și a receptorilor specifici, iar datele referitoare la limfangiogeneza sunt lacunare.

Din aceste puncte de vedere ne-am propus câteva obiective legate de profilul molecular al acestor tumori la nivel de expresie proteică, explorarea angiogenezei și limfangiogenezei, beneficiind și de faptul că spre deosebire de tumorile maligne dezvoltate în alte organe, tumorile cavității bucale formează un grup morfologic omogen, la care criteriile de diagnostic histopatologic și gradare sunt bine standardizate și acceptate. În acest sens, ne-am propus să evaluăm: valoarea prognostică a microdensității vasculare sanguine și limfatice, și rolul în predicția metastazelor limfonodale. Evaluarea tipurilor de vase sanguine asociate tumorii, ca potențială țintă terapeutică, împreună cu elucidarea originii vaselor de neoformație. Am luat în studiu unii dintre factorii de creștere, care stimulează formarea de noi vase, dar în același timp există deja inhibitori specifici. Nu în ultimul rând, am făcut o analiză epidemiologică a prevalenței și incidenței carcinomului scuamocelular din zona capului și gâtului, insistând pe particularitățile din zona noastră geografică.

Sperăm că prin rezultatele obținute de noi pe parcursul acestei cercetări vor genera răspunsuri la aceste întrebări și vor contribui la o mai bună

cunoaștere a biologiei moleculare a carcinoamelor scuamocelulare orale, deschizând noi perspective pentru terapia adjuvantă la acești pacienți.

## **STUDIUL I. ANALIZA EPIDEMIOLOGICĂ A INCIDENȚEI CANCERULUI ORAL ÎN EUROPA CENTRALĂ ȘI DE EST**

### *Cancerul oral, cancerul laringian și faringian*

Pentru cavitatea orală, cancerul laringian și faringian s-au observat 686328 de cazuri noi în 2012 și au fost 375665 de decese în același an. Cea mai mare incidență a fost în Vestul Europei, unde incidența ASR/100000 de persoane a fost 13, iar în țările mai dezvoltate incidența a fost mai mare decât în țările mai puțin dezvoltate, dar mortalitatea a fost mai mare în țările mai puțin dezvoltate. Incidența cancerului oral, laringian și faringian de 11.5 este mai mare în CEE decât incidența globală, care este 9, sau decât cea pentru țările mai dezvoltate, unde a ajuns la 10.4. Mortalitatea prin cancer oral și faringian este mai mare în CEE decât în celelalte regiuni studiate.

### *Cancer de buze și cavitatea bucală*

300373 (4) cazuri noi de cancer de buză și cavitate bucală au fost diagnosticate în lume, 199550 (3.7) în țările mai puțin dezvoltate, 100823 (4.7) în țările mai dezvoltate și 23765 și incidența 5 din CEE. Incidența globală a cancerului de buză și de cavitate orală la bărbați 5.5 este mai mare decât femeii, unde a fost de 2.5. În CEE, incidența la bărbați este de 9.1 și este a treia cea mai mare incidență din regiunile din lume după Melaiezia 22.9 și Asia de Sud-Central 9.9. La femeile din CEE incidența este de două ori mai mică decât în Vestul Europei unde este de 3.2, mai mare decât în regiunile dezvoltate unde este 2.8 sau în regiunile mai puțin dezvoltate 2.5. Din țările CEE, cea mai mare incidență este în Ungaria 9.7, urmată de Slovacia 6.5. În România, în 2012, au fost diagnosticați 1847 (5.4) de cazuri noi de cancer de buză și cavitate orală și au murit 1001 (3). 145323 de persoane au murit la nivel mondial din cauza cancerului de buză și de cavitate orală care reprezintă o mortalitate/ 100000 de persoane de 1.9. În CEE au murit 12516 persoane (2.6). Mortalitatea a fost, de asemenea, mai mare la bărbați decât la femeii, raportul bărbați: femeii fiind de 2.7: 1.2 în lume, și de 5.1: 0.7 în CEE. Cea mai mare mortalitate/ 100000 de locuitori din țările din CEE a fost întâlnită în Ungaria 4.4 urmată de Slovacia și Belarus 3.2. Bărbații din Ungaria au cea mai mare rată de mortalitate din țările din CEE 23.2, urmată de bărbații români 19.4 și din Slovacia 18.4. Pentru femeii, de asemenea, cea mai mare mortalitate a fost înregistrată în Ungaria 8.4, urmată de femeile din Polonia 4.2 și de cele din Slovacia 3.9.

### *Cancerul faringian*

229078 (3.1) cazuri noi de cancer faringian au fost diagnosticate la nivel mondial în 2012 și au fost înregistrate 146936 (1.9) de decese din cauza acestei patologii. În CEE au fost diagnosticați 13216 (3) persoane și au murit 9159 (2). Incidența cancerului faringian în CEE, a fost mai mică decât cea întâlnită în vestul Europei 4.8, sau în regiunile dezvoltate, unde incidența a fost de 3.1 și decât în regiunile mai puțin dezvoltate unde incidența a fost de 3.2, dar mortalitatea a fost mai mare decât în Vestul Europei 1.7, în regiunile dezvoltate



1.3 și mai mică decât în regiunile mai puțin dezvoltate 2.2. La fel ca în cazul cancerului de buză și cancerului cavității orale, bărbații maghiari sunt al doilea cei mai afectați din lume (14.1), bărbații români situându-se pe poziția a cincea. Din țările CEE, cea mai mare incidență a fost înregistrată în Ungaria 7.8, urmată de România 6.1 și Slovacia 5.5. Cea mai mare incidență a cancerului faringian a fost găsită la bărbații maghiari 14.1, urmați de bărbații români 12.1 și bărbații slovaci 10.7. La femei, cea mai mare incidență a fost găsită tot în Ungaria 2.4, urmată de femeia cehă 1.5 și cea din Republica Moldova. Mortalitatea în ordine descrescătoare, cauzată de cancerul faringian în țările CEE a fost în Ungaria 4.9, urmată de Slovacia 4.1 și România 3.8. Mortalitatea cea mai mare a fost la bărbații maghiari 9.2, urmată de bărbații slovaci 8.3 și români 7.4. Mortalitatea la femei din țările studiate a fost scăzută, dar cea mai mare s-a constatat în Ungaria 1.3, Bulgaria 0.8, România 0.6 și Slovacia 0.6.

#### *Cancer de laringe*

156977 (2.1) noi cazuri de cancer de laringe au fost diagnosticate la nivel Mondial, și 83376 (1.1) au murit din cauza acestuia. În țările CEE au fost diagnosticați 16494 de persoane (3.6) și au murit 2.2, această regiune fiind a patra regiune cea mai afectată din lume, după Caraibe (4.2), Europa de Sud (3.7) și Asia de Vest (3.6). Incidența și mortalitatea pentru cancerul de laringe este mai mare în CEE decât în Vestul Europei 2.7 / 0.8, țările mai dezvoltate 2.7 / 1.1 și țările mai puțin dezvoltate 1.9 / 1.1. Bărbații maghiari ocupă locul cinci în lume la incidența cancerului de laringe 12.3, iar bărbații români locul 7 cu 10.4, iar pe primul loc se află Cuba cu 10.4. Ca și la nivelul buzelor și al cavității bucale și al cancerului faringian în Ungaria sunt cele mai mari incidențe/ 100000 de locuitori din țările CEE 6,3 (12.3 pentru bărbați și 1.4 pentru femei). Pe locul doi se află Republica Moldova 5.4 (11.4 pentru bărbați și 0.3 pentru femei), iar pe locul trei se află România 5 (10.4 bărbați și 0.4 femei). Pentru femei, a doua țară afectată este Polonia 0.9 și a treia este Cehia 0.5. Mortalitatea / 100000 de persoane datorată cancerului de laringe o întâlnim la bărbații moldoveni 7.6, urmată de bărbații bulgari 6.7, unguri și români 6.2.

*Concluzii parțiale.* Incidența cancerului de cap și gât are un trend crescător pentru cancerul de faringe și planșeu oral și descrescător pentru cancerul de laringe și cel de buză. Incidența și mortalitatea prin cancer de cap și gât în țările din Europa Centrală și de Est sunt diferite în funcție de țară, Ungaria, România și Slovacia având cele mai mari rate de îmbolnăvire și mortalitate din regiune. Diferențele dintre sexe este de asemenea foarte mare, bărbații din Europa Centrală și de Est sunt foarte afectați, fiind a treia cea mai afectată regiune de pe glob, iar femeile fiind pe locul patru. Cei mai afectați de cancerul de cap și gât sunt locuitorii Ungariei, în special bărbații. Consumul de alcool și tutun sunt cei mai importanți factori de risc pentru bărbații din Europa Centrală și de Est, iar cele mai multe țări din lume au implementat până în prezent recomandările OMS pentru politicile de sănătate publică anti-fumat și anti consum de alcool. Mortalitatea foarte mare cauzată de cancerul de cap și gât în Europa Centrală și de Est poate fi redusă printr-o strategie națională sau regională combinată cu educație pentru sănătate aplicată întregii populații cu

informare privind simptomele precoce ale cancerului de cap și gât, introducerea screeningului pentru cancerul oral la medicul de familie și/ sau dentist, sau prin îmbunătățirea metodelor de diagnostic.

## **STUDIUL II. STUDIU HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOPATOLOGIC A LEZIUNILOR PREMALIGNE ȘI MALIGN SCUAMOCELULARE DE LA NIVEL ORAL**

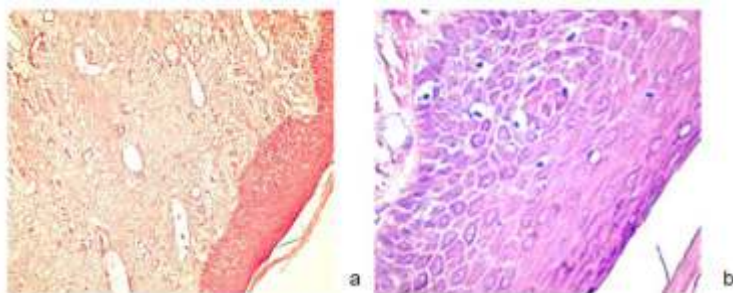
În studiul prezent au fost incluși 56 de pacienți la care diagnosticul histopatologic a fost de carcinom scuamocelular cu diferite grade de diferențiere, localizat în sfera cavității orale. Specimenele au provenit de la Clinica de Chirurgie Buco-Maxilo-Facială, clinica de ORL și Chirurgie orală a Universității de Medicină și Farmacie din Timișoara, în perioada 2017-2020.

Acest studiu are trei direcții de cercetare:

- Evaluarea morfologică și gradul de diferențiere
- expresia podoplaninei și densitatea microvasculară limfatică în celulele tumorale
- Clasificarea moleculară

### **REZULTATE**

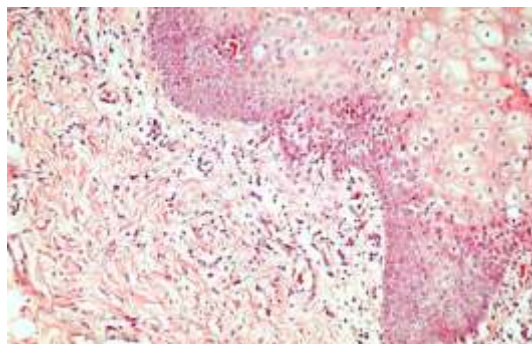
La toate cazurile incluse în studiu, marginile de rezecție au prezentat țesut normal, incluzând epiteliul de acoperire și lamina propria. Epiteliul mucoasei orale a fost format din celule dispuse în straturi, organizate bazal, intermediar și superficial, și așa cum se observă și în condiții normale, ocazional cu zone de parakeratoză. Lamina propria a fost formată din țesut conjunctiv lax și dens dezordonat, cu rare celule conjunctive mobile și cu numeroase vase sanguine și limfatice cu lumen regulat, relativ larg (*fig.1 a*). Componenta epitelială relevă organizarea celulelor în straturi distincte, cele mai numeroase fiind cele de tip intermediar, cu dimensiuni medii, relativ egale, poligonale, care formează între ele joncțiuni de adeziune. La toate cazurile am observat prezența stratului granulos (*fig.1 b*). În porțiunea bazală a epitelului am remarcat prezența de celule izolate cu halou pericelular cromofob și nuclei intens colorați.



**Figura 1.** Epiteliul oral normal, aspect de ansamblu cu zone de parakeratoză și vase în lamina propria (a, x100). Detaliu asupra epitelului de acoperire normală, care reflectă organizarea celulelor sub formă de straturi ordonate și prezența stratului granulos (b, x400). Colorație hematoxilină-eozină.

Hiperplazia epitelială focală am notat-o la 14 dintre cele 56 de cazuri la nivelul epiteliului limitrof proliferării maligne. Această leziune, care s-a demonstrat încă de mai mulți ani, că este indusă de virusul papiloma uman, poate să apară și ca leziune izolată de tip nodular. La cazurile noastre a fost caracterizată microscopic de creșterea numerică a celulelor stratului bazal, care este mai gros, celulele fiind dispuse pe mai multe rânduri. Stratul intermediar a fost format din numeroase rânduri de celule balonizate, cu citoplasmă palid colorată sau cromofobă (*fig. 2*). În porțiunea bazală a epiteliului hiperplazic am constatat prezența de mici papile conjunctive cu vase sanguine dilatate conținând elemente figurate sanguine. Acest aspect susține debutul precoce al angiogenezei în timpul inițierii carcinogenezei și evoluției naturale a neoplaziei scuamocelulare orale, aspect raportat și de alți autori. Lamina propria corespondentă hiperplaziei epiteliale focale a prezentat fibre de collagen dispuse în fascicule groase și densitate crescută a infiltratului inflamator în comparație cu mucoasa normală.

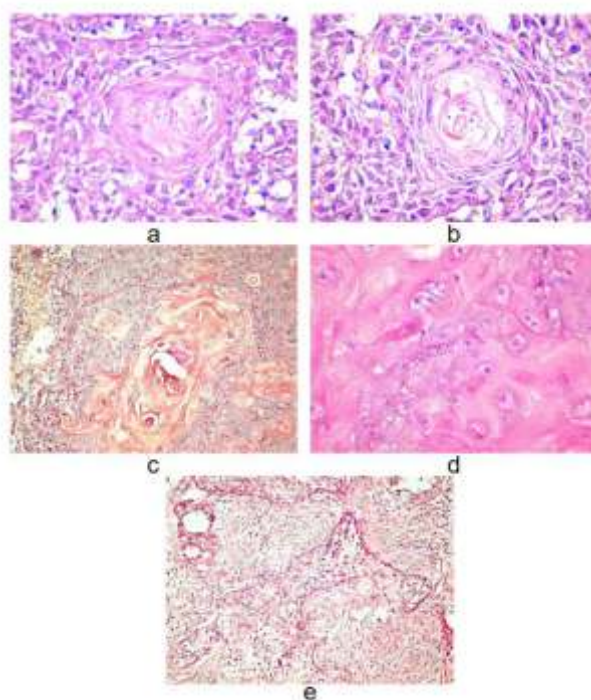
Tumoriile cu diagnosticul de carcinom scuamocelular au prezentat proliferare difuză de celule tumorale așezate sub formă de lobuli, cordoane, cuiburi, sau plăci compacte, întinse, de diferite dimensiuni, invadând stroma. Toate carcinoamele incluse în acest studiu au fost invazive, iar dintre acestea, tumora a depășit 5 mm profunzime la 33 dintre pacienți.



**Figura 2.** Hiperplazie epitelială focală, caracterizată prin numărul crescut de celule bazale și balonizarea celulelor din stratul intermediar. Colorație hematoxilină-eozină, x400.

Keratinizarea intracelulară și extracelulară este una dintre caracteristicile carcinomului scuamocelular, pe care am observat-o la 29 și respectiv 36 dintre cazurile incluse în studiu. Aspectul definitoriu al acestui proces este reprezentat de către perlele keratozice și parakeratozice, pe care le-am observat la toate cazurile bine diferențiate și doar la unul dintre cazurile slab diferențiate. Perlele parakeratozice și keratozice au avut dimensiuni diferite, fiind formate din celule dispuse concentric, cu variate grade de degenerare în zona centrală, care în unele cazuri a avut aspect microchistic (*figura 3a*). Uneori, cavitatea a fost delimitată de celule tumorale aparent viabile (*figura 3b*). La tumorile bine diferențiate, frecvent aceste zone se prezintă ca mase intens acidofile, amorfe, care ocupă suprafețe întinse din interiorul proliferării (*figura 3c*).

Celulele tumorale individuale s-au caracterizat prin aspecte de pleomorfism celular- nuclear (moderat și sever), darne-a atras atenția relativa uniformitate a nucleilor, rotunzi sau ovalari cu aspect eucromatic, palid colorată, cu bazofilie redusă. Hiperplazia și hipertrofia nucleolilor, la care se adaugă anizonucleoloza, au fost constant observate, în special la cazurile cu diferențiere slabă sau cele nediferențiate. Doar în anumite situații și focal am remarcat existența celulelor apoptotice, cu nucleu intens colorat și citoplasma omogen acidofilă. Raportul nucleo-citoplasmatic, deși modificat, este rareori supraunitar. Keratinizarea intracitoplasmatică am observat-o la 29 dintre cele 56 de cazuri și a fost caracterizată de acidofilia intensă și omogenă care uneori are tendința de a masca conturul nucleului *figura 3d*). Chiar și în aceste condiții, la nivel nuclear se observă nucleoli măriți în volum, multipli și diferiți ca dimensiune pentru același nucleu, criteriu important pentru aprecierea malignității celulare.



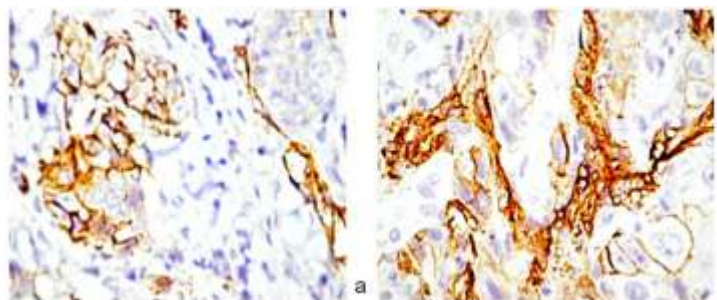
**Figura 3.** Perlă keratozică (a). Transformare microchistică delimitată de celule tumorale (b). Acumulare masivă de keratină în zona centrală a tumorii (c). Keratinizare masivă intracelulară, acidofilie intensă și omogenă (d). Plaje întinse și neregulate de celule tumorale, cele periferice fiind diferite morfologic de cele din zona centrală (e). Colorație hematoxină-eozină.

### **Expresia podoplaninei și densitatea microvasculară limfatică și în celulele tumorale**

În vederea evaluării elementelor mai sus amintite am studiat expresia podoplaninei/D2-40 la cele 56 de cazuri de carcinom scuamocelular din sfera orală, la care am prelevat biopsii de la nivelul prelevate de la nivelul buzei (n=36), mucoasei orale (n=5), limbii (n=9) și faringelui (n=6). Am urmărit prezența, morfologia și densitatea vaselor limfatice, prezența invaziei

limfovaskulare și expresia D2-40 în celulele tumorale. Dintre cazurile incluse în studiu, 19 au prezentat metastaze limfonodale regionale.

Expresia podoplaninei/D2-40 în celulele tumorale a fost semnalată pentru mai multe tumori umane, printre care și carcinoamele scuamocelulare din regiunea capului și gâtului. Pe materialul nostru, imunoreacția a fost pozitivă cu diferite grade de intensitate în 41 dintre cele 56 de cazuri (73.21%). În evaluarea imunoreacției pozitive am luat în considerare modelul de distribuție al produsului final de reacție și procentul de celule tumorale pozitive. În acest fel am identificat două subgrupe de tumori pozitive, aspecte corelabile cu gradul de diferențiere. Reacția pozitivă la majoritatea celulelor tumorale, model de expresie pe care l-am denumit difuz, a fost identificată la tumorile moderat și slab diferențiate, intensitatea cea mai mare fiind observată la nivelul frontului de proliferare și în imediata vecinătate a vaselor limfatice (*figura 4a*). La aceste cazuri, produsul final de reacție a fost localizat predominant membranar, dar și difuz în citoplasma unor celule tumorale izolate (*figura 4b*). Cel de al doilea model de distribuție, asociat adesea tumorilor G1, este tot heterogen, dar mimează ca localizare stratul de celule bazale din epiteliul normal. La aceste cazuri reacția a fost restricționată membranar, iar la cazurile foarte bine diferențiate, cu keratinizare extensivă, reacția a fost foarte slabă în celulele tumorale, limitată la un lizereu fin membranar.



**Figura 4.** Model de expresie al D2-40 în celulele tumorale difuz și heterogen la nivelul frontului de invazie, în vecinătatea unui capilar limfatic (a). Pattern membranar și citoplasmatic în celule izolate (b). X400.

**Concluzii parțiale.** Studiul a 56 de cazuri de carcinom scuamocelular oral cu ajutorul imunoreacției pentru podoplanină/D2-40 a relevat următoarele aspecte: vasele limfatice D2-40 pozitive au fost prezente în aria tumorală și peritumorală, dar morfologia lor este diferită. LMVD este mai mare pentru vasele intratumorale, decât pentru cele peritumorale și pentru ambele valorile au fost mai mari decât pentru mucoasa normală. Metoda cu D2-40 este deosebit de utilă pentru detecția invaziei limfovaskulare, neidentificată pe secțiunile colorate cu hematoxilină – eozină. Celulele tumorale exprimă D2-40 la 73.21% dintre cazuri, aspect corelabil cu gradul de diferențiere și invazia locală.

#### **Clasificarea moleculară**

În studiul prezent am investigat retrospectiv 42 dintre cazurile incluse în studiu, selecționând un lot omogen la care criteriul principal de includere a fost reprezentat de forma histopatologică, respectiv carcinom scuamocelular cu



diferite grade de diferențiere. Cele 42 de cazuri au avut următoarea localizare: laringe 27 de cazuri, faringe 12, și cavitate orală 3. Biopsiile au fost incluse în parafină pentru evaluarea morfologică și moleculară la nivel proteic. De la fiecare caz și bloc au fost efectuate secțiuni seriate cu grosimea de 3  $\mu$ m, lipite pe lame pentru imunohistochimie. Secțiunile inițiale au fost colorate cu hematoxină-eozină, varianta standard, pe baza cărora s-a reanalizat forma histopatologică, gradul de diferențiere și extensia componentei scuamoase bine diferențiate (incidența și extensia perlelor keratozice și parakeratozice). Celelalte secțiuni au fost supuse procedurii imunohistochimice complet automatizate (Bond Max, Leica Microsystems, Milton Keynes, UK). Selecția markerilor tumorali s-a realizat pe baza datelor existente și a valorii lor prognostic în evoluția tumorilor maligne și impactul pe care îl au în modelarea atitudinii terapeutice.

Anticorpii utilizați în această parte a studiului au fost: receptorul pentru factorul epidermal de creștere (EGFR, Novocastra), citokeratina 5, Bcl-2 și E-cadherina. La cazurile la care citokeratina 5 și EGFR au fost pozitive s-au efectuat metodele pentru proteina p53 și receptorul pentru factorul de creștere al celulelor stem, CD117 sau c-kit, pentru a identifica celulele cu potențial de elemente stem. Procedura imunohistochimică a utilizat un sistem de lucru și vizualizare fără biotină (Bond Refine Detection System, DAB, Leica, Microsystems), iar produsul final de reacție a fost colorat în brun la nivel nuclear (pentru p53 și p63), citoplasmatic (pentru citokeratina 5 și CD117) și membranar (pentru EGFR și E-cadherină). Co-localizarea p53 cu EGFR, și p63 cu CD117 s-a realizat prin dublă imunohistochimie standard la care s-a adăugat Bond Refine Detection System Red.

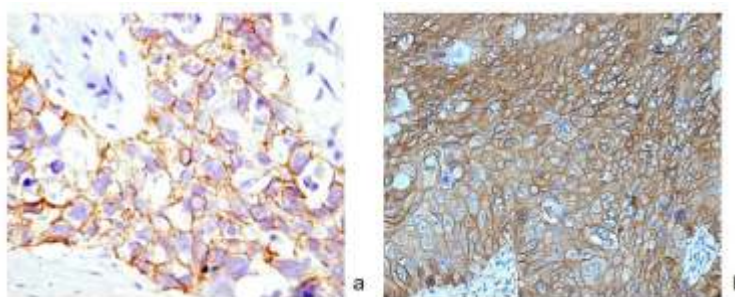
Pentru evaluarea microscopică am aplicat criteriile de interpretare acceptate pentru acești markeri, bazat pe intensitatea reacției și procentul de celule tumorale pozitive. Corelațiile rezultatelor imunohistochimice cu stadiul tumorii, gradul de diferențiere, TNM au fost efectuate pentru a anticipa rolul prognostic și potențial terapeutic al acestor investigații, la cazurile cu HNSCC.

#### REZULTATE

Toate cazurile incluse în studiu au fost carcinoame scuamocelulare cu sau fără prezența perlelor keratozice și parakeratozice. Dintre cazurile care au constituit acest grup 64% au fost localizate la laringe, 28.5% la faringe și 7.3% în cavitatea bucală, mai precis la limbă. Gradul de diferențiere majoritar la cazurile incluse a fost G2, reprezentând 73.8%. Incidența pacienților cu G1 a fost de 7.14%, iar cu G3 de 19%. Dintre parametri clinico-patologici cu relevanță prognostică, am analizat elementul T, cele mai multe cazuri fiind T3 (45.2%) și T2 (38%). Un singur caz a fost T1 (2.3%), semnalând încă odată depistarea precoce deficitară, și T4 6 cazuri (14.5%). Caracterul agresiv al acestor tumori reiese și din distribuția cazurilor în funcție de elementul N: 64.28% cazuri cu N1, 26.19% cu N2 și 9.52% cu N3. Metastaze la distanță am notat la patru cazuri, 90.47% fiind clasificate ca M0.

În prima etapă am evaluat expresia imunohistochimică a markerilor menționați mai sus EGFR, Bcl2, citokeratina 5, p53 și E-cadherina. EGFR a fost

exprimat la un mare număr de cazuri, produsul final de reacție fiind exclusiv membranar sau citoplasmatic cu intensificare semnificativă membranară. Având în vedere tipul de marker, produsul de reacție membranar a fost considerat esențial pentru interpretare (*figura 5.a și figura 5b*).



**Figura 5.** Imunoreacție pentru EGFR. Produs final de reacție restricționat membranar (a) și citoplasmatic cu intensificare membranară (b). x400.

La raportarea rezultatelor semnalăm marea variabilitate de expresie a markerilor menționați și exemplificați mai sus. La evaluarea generală a cazurilor cu HNSCC am obținut corelație statistic semnificativă între gradul de diferențiere și expresia Bcl2 ( $p=0.033$ ), între parametrul M și expresia EGFR ( $p=0.039$ ), și între expresia EGFR și p53 ( $p=0.001$ ). p53a fost exprimat la un număr reprezentativ de celule tumorale la jumătate din numărul total de cazuri studiate. Toate cazurile p53 pozitive au coexprimat EGFR, dar pe de altă parte, nu toate cazurile EGFR pozitive au exprimat p53. Nu am identificat alte diferențe semnificative între cazurile p53 pozitive/negative cu ceilalți markeri investigați.

Expresia EGFR în cazurile cu HNSCC a relevat un procentaj mare de cazuri pozitive, respectiv 85.71% au prezentat reacție intensă sau moderată. Jumătate dintre cazurile EGFR pozitive au co-exprimat p53. La cazurile EGFR pozitive am observat cel mai mare număr de cazuri citokeratin 5 pozitive. Co-expresia EGFR – citokeratină 5 a fost notată la 61% dintre toate cazurile și această combinație atrage atenția asupra unui subtip particular. Este binecunoscut faptul că epiteliul stratificat normal din regiunea capului și gâtului exprimă EGFR restricționat la celulele stratului bazal. În HNSCC supraexpresia EGFR s-a asociat frecvent cu citokeratina 5, sugerând că acest subgrup ar fi un derivat al celulelor bazale prin activarea unor factori cu potențial de celule progenitoare. În continuare am considerat util să caracterizăm acest subgrup prin investigarea expresiei p63 și c-kit, CD117. Co-expresia CD117 și p63 am identificat-o la 75% dintre cazurile citokeratin 5/EGFR pozitive, adică 42.28% din totalul cazurilor investigate. Pe baza acestor aspecte putem tenta propunerea subtipului bazal-like al HNSCC, definit ca EGFR pozitiv – citokeratină 5 pozitiv, CD117 pozitiv și p63 pozitiv. Pentru acest grup am găsit corelație statistic semnificativă între G și expresia p63 ( $p=0.01$ ) și de asemenea între T și expresia CD117 ( $p=0.04$ ).

În ciuda numărului mic de cazuri EGFR negative raportate în studiul actual, acestea formează un subtip particular, cazurile fiind negative pentru toți markerii studiați. Ocazional, citokeratina 5 și E-cadherina au fost pozitive la 50% dintre cazurile acestui grup, dar pe baza lor nu se poate constitui un subtip aparte. Având în vedere numărul mic de cazuri din acest grup nu am evaluat parametri statistici pentru cazurile EGFR-negative. Bcl2 și p53 par să fie exprimați cu frecvență mare la cazurile EGFR-pozitive, și sunt constant negative la cei cu EGFR-negativitate. Corelând datele obținute pe baza expresiei p53, Bcl2 și EGFR, putem defini trei subtipuri distincte: *EGFR+/p53-/bcl2-*, *EGFR+/p53+/bcl2-* și *EGFR+/p53+/bcl2+*. Din analiza statistică a subtipului *EGFR+/p53+/bcl2-*, reiese că la acest grup, expresia EGFR se corelează cu statusul limfonodulilor ( $p=0.04$ ) și cu coexpresia CD117/p63 ( $p=0.04$ ). Citokeratina 5 a fost pozitivă la 59.5% dintre cazuri, cea mai frecventă co-expresie fiind observată cu EGFR și CD117/p63. Pentru aceste cazuri am notat relație statistică inversă între elementul T și coexpresia p53/EGFR ( $p=-0.03$ ) și corelație pozitivă între T și expresia CD117/p63 în celulele tumorale ( $p=0.01$ ). Statusul limfonodal s-a corelat semnificativ cu expresia Bcl2 ( $p=0.04$ ). Datorită numărului mic al cazurilor cu metastaze nu am evaluat statistic elementul M.

**Concluzii parțiale.** Rezultatele noastre susțin necesitatea clasificării moleculare a HNSCC doar pe baza expresiei markerilor tumorali și analizei genice. Prin metode imunohistochimice am identificat cu certitudine subtipul *EGFR+/citokeratina 5+*, subcalsificat ulterior în funcție de expresia p53, Bcl 2, și CD117. Considerăm că sunt necesare studii pe serii mari de bolnavi care să permită aplicarea unei terapii combinate de tip țintit.

### **STUDIUL III. SCREENINGUL CANCERULUI ORAL PRIN METODA VELSCOPE VX**

Pentru realizarea acestui studiu am efectuat examinarea vizuală directă convențională și examinarea comparativă cu VELscopeVx care permite vizualizarea unei zone cu pierderea fluorescenței, a leziunilor premaligne întâlnite într-un cabinet de stomatologie.

VELscope-ul nu poate pune diagnosticul direct de cancer, acesta se pune doar cu ajutorul biopsiei și a examenului histopatologic, dar este un adjuvant al examinării orale și este considerat de către specialiștii în domeniu un dispozitiv fantastic neinvaziv de screening pentru depistarea precoce a leziunilor premaligne sau maligne, care nu sunt vizibile cu ochiul liber. Folosirea VELscope-ului are la bază detectarea precoce a celulelor displazice, care au o capacitate de absorbție diferită de cea a celulelor normale, astfel se evidențiază cele mai mici modificări tisulare precoce. Sistemul VELscope Vx folosit a permis: examinarea în timp real a cavității orale; identificarea și diagnosticarea leziunilor orale care necesită tratament ulterior; leziunile maligne și premaligne prin evidențierea pierderii locale a fluorescenței; camera foto, care a permis documentarea și evaluarea leziunilor.



Cancerul oral este în general detectat după examinarea convențională vizuală directă realizată de medic.

#### REZULTATE

Caracteristicile subiecților luați în studiu

Nr. pacient	Vârstă	sex	Localizarea leziunii	Modificări clinice	Intensitatea și mărimea pierderii fluorescenței vizuale	Examen histopatologic
1	34	F	față laterală a limbii	Zonă eritematoasă bine definită	Zonă întunecoasă bine definită	
2	43	F	Fața laterală a limbii	Tumora de aproximativ 1 cm în diametru, arie eritematoasă	Zonă întunecoasă bine definită	
3	48	M	fața antero-laterală dreapta a limbii	Parțial eritematoasă parțial delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
4	53	M	Mucoasă palatină	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
5	76	F	Vermiliomului lingual	Parțial bine delimitată, zonă eritematoasă, ulcerată	Zonă întunecoasă bine definită	Carcinom scuamocelular
6	68	M	Gingie superioară stângă	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
7	51	F	Palatul moale și dur	Parțial delimitată, zonă eritematoasă	Zonă întunecoasă bine definită	
8	46	M	Limba dorsală față	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
9	73	M	Gingie anterioară superioară	Parțial eritematoasă slab delimitată	Zonă ușor demarcată	
10	82	F	Palatul dur	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
11	68	M	Gingie inferioară dreapta	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	
12	64	F	Planșeul bucal	Parțial eritematoasă bine delimitată	Zonă întunecoasă bine definită	

Detectarea leziunilor premaligne orale înainte ca acestea să treacă la nivelul de malignitate este necesară pentru a îmbunătăți ratele de supraviețuire pentru cancerul oral. Mai multe studii au demonstrat că VELscope Vx este un test simplu, neinvaziv și nu foarte costisitor al mucoasei bucale, care poate ajuta clinicianul experimentat să găsească leziuni pre maligne orale/ maligne în stadii

mai incipiente și locația corectă pentru efectuarea biopsiilor în mucoasa modificată.

În literatura de specialitate, folosirea VELscope-ului Vx este considerat că are capacitate limitată de a discrimina leziunile cu risc ridicat spre malignitate de cele fără risc de malignitate. În orice caz, inspecția vizuală convențională sub lumină incandescentă normală, urmată de biopsia leziunilor suspicioase, va rămâne standardul de aur pentru viitorul imediat. Abordările viitoare ale imagisticii optice ar putea implica o evaluare cantitativă în timp real pentru a determina un diagnostic pentru leziunile mucoasei bucale, mai degrabă decât să evidențieze pur și simplu prezența anomaliilor, făcând astfel posibilitatea „biopsiei optice” o realitate clinică.

#### **CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII**

1. Incidența cancerului de cap și gât are un trend crescător pentru cancerul de faringe și planșeu oral și descrescător pentru cancerul de laringe și cel de buză.
2. Incidența și mortalitatea prin cancer de cap și gât în țările din Europa Centrală și de Est sunt diferite în funcție de țară, Ungaria, România și Slovacia având cele mai mari rate de îmbolnăvire și mortalitate din regiune.
3. Diferențele dintre sexe este deasemenea foarte mare, bărbații din Europa Centrală și de Est sunt foarte afectați, fiind a treia cea mai afectată regiune de pe glob, iar femeile fiind pe locul patru. Cei mai afectați de cancerul de cap și gât sunt locuitorii Ungariei, în special bărbații.
4. Consumul de alcool și tutun sunt cei mai importanți factori de risc pentru bărbații din Europa Centrală și de Est, iar cele mai multe țări din lume au implementat până în prezent recomandările OMS pentru politicile de sănătate publică anti-fumat și împotriva consumului de alcool.
5. Mortalitatea foarte mare cauzată de cancerul de cap și gât în Europa Centrală și de Est poate fi redusă printr-o strategie națională sau regională combinată cu educație pentru sănătate aplicată întregii populații cu informare privind simptomele precoce ale cancerului de cap și gât, introducerea screeningului pentru cancerul oral la medicul de familie și/ sau dentist, sau prin îmbunătățirea metodelor de diagnostic.
6. Studiul a 56 de cazuri de carcinom scuamocelular oral cu ajutorul imunoreacției pentru podoplanină/D2-40 a relevat următoarele aspecte:
  - vasele limfatice D2-40 pozitive au fost prezente în aria tumorală și peritumorală, dar morfologia lor este diferită.
7. LMVD este mai mare pentru vasele intratumorale, decât pentru cele peritumorale și pentru ambele valori au fost mai mari decât pentru mucoasa normală.
8. Metoda cu D2-40 este deosebit de utilă pentru detecția invaziei limfovaskulare, neidentificată pe secțiunile colorate cu hematoxilină –

eozină. Celulele tumorale exprimă D2-40 la 73.21% dintre cazuri, aspect corelabil cu gradul de diferențiere și invazia locală.

9. VELscope-ul VX oferă posibilitatea diagnosticării prezumtive de acuratețe mai mare, care poate evalua leziuni cu potențial malign, care în urma efectuării biopsiei și a examenului histopatologic ajută la îndrumarea pacientului spre diferite metode de tratament, fie ele chirurgicale, radioactive sau chimioterapie.
10. Viziunea asupra depistării leziunilor precanceroase sau chiar canceroase, este una pozitivă și dorită, însă reticența pacienților uneori își spune cuvântul. Frica de a primi o veste rea, sau un diagnostic grav, împiedică multe persoane să aleagă efectuarea acestor analize.

#### **Contribuții proprii**

Rezultatele noastre susțin necesitatea clasificării moleculare a HNSCC doar pe baza expresiei markerilor tumorali și analizei genice. Prin metode imunohistochimice am identificat cu certitudine subtipul EGFR+/citoketatina 5+, subcalsificat ulterior în funcție de expresia p53, Bcl 2, și CD117.

#### **Direcții viitoare de cercetare**

Considerăm că sunt necesare studii pe serii mari de bolnavi care să permită aplicarea unei terapii combinate de tip țintit.