

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II: MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ

CRISTINA-ȘTEFANIA DUMITRU



TEZĂ DE DOCTORAT

PARTICULARITĂȚI MOLECULARE ALE CARCINOAMELOR
DE CAP ȘI GÂT. IMPLICAȚII DIAGNOSTICE ȘI POTENȚIAL
TERAPEUTIC

REZUMAT

Conducător de doctorat
PROF. UNIV. DR. MARIUS RAICA

Timișoara
2022

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate	V
Lista cu abrevieri și simboluri	VI
Lista cu figuri	IX
Lista cu grafice	XI
Lista cu tabele	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE	XV

PARTEA GENERALĂ

1. Forme histopatologice HNSCC	1
2. Progresia naturală HNSCC	6
3. Profilul molecular	11
4. Elemente de prognostic	20
5. Metode terapeutice convenționale și moderne	25

PARTEA SPECIALĂ

1. Motivație	32
2. Material și metodă	33
3. Raportarea rezultatelor morfologice	38
4. Rata de proliferare a celulelor tumorale identificate prin indexul Ki-67	46
5. Expresia imunohistochimică a E-cadherinei	55
6. Expresia celulelor prezentatoare de antigen: S100 și CD1a	61
7. Expresia Podoplaninei	67
8. Rezultate	73
9. Discuții	87
CONCLUZII	94
BIBLIOGRAFIE	96
ANEXE	I

INTRODUCERE

Datorită creșterii cu timpul a incidenței carcinoamelor scuamocelulare în sfera ORL, a numeroși factori de risc incriminați cât și a afectării diferitelor grupe de vârstă, îndreptățește o atentă studiere a acestei patologii. Aceasta devenind în prezent o problemă majoră de sănătate la nivel mondial. Carcinomul scuamocelular de cap și gât (HNSCC) ocupă un loc aparte în patologia neoplazică, nu numai din prisma diagnosticului etiologic cât și din punct de vedere al răsunetului și impactului complex asupra funcțiilor umane fundamentale: fonația și respirația, masticație și deglutiție, audição, impactul psihologic și social.

Cum ultimele studiile statistice arată o continuă creștere anuală atât a incidenței cât și a mortalității, consideram ca este absolut necesară o îmbunătățire a prevenției primară și secundară, stabilind metode noi de diagnostic și tratament. Astfel, am efectuat studii morfologice și imunohistochimice (IHC) asupra probelor diagnosticate cu HNSCC, utilizând următorii anticorpi primari: E-cadherina, Ki-67, Podoplanina, S100 și CD1a. Am obținut în aceasta lucrare rezultate importante cu impact în posibile viitoare terapii și am demonstrat rolul markerilor imunohistochimici în prognosticul bolii, potențialul de recidivă tumorală, metastazare ganglionară.

De asemenea, considerăm importantă depistarea precoce a tumorilor, încă din stadiul de leziuni preneoplazice, dar și cunoașterea procesului de carcinogeneză, elaborarea unor tratamente țintite și personalizate pentru fiecare pacient, acest lucru fiind posibil prin efectuarea analizei IHC cu markeri corespunzători. Importanța studiului particularităților moleculare ale HNSCC într-un proiect de cercetare este ghidată de urmărirea instituirii tehnicilor imunohistochimice în uzul curent, punerea unui diagnostic corect, de acuratețe și implementarea unei potențiale terapii de tratament moderne pe baza studiului IHC.

Scopul studiului

Tema propusă abordează un proiect de cercetare de o importanță globală în domeniul studiului carcinoamelor scuamocelulare de cap și gât, datorate localizării și

progresiei agresive a patologiei ce are un grad ridicat de mortalitate, contrar diferitelor abordări terapeutice.

De-a lungul ultimilor ani formularea diagnosticului și aplicarea unei metode terapeutice adecvate în HNSCC a devenit o provocare pentru specialiștii ORL cu implicații multidisciplinare. Statisticile au demonstrat un impact individual, social și economic al managementului diagnostic și terapeutic ce necesită o atentă studiere din punct de vedere al particularităților moleculare ale carcinomului scuamocelular (SCC) cât și dezvoltarea unor protocoale de clasificare eficiente cu valoare prognostică și terapeutică. Cum studiile statistice recente arată o continuă creștere anuală atât a incidenței cât și a mortalității este absolut necesară o îmbunătățire a lor, mărin­d astfel domeniile de prevenție primară și secundară, stabilind metode noi de diagnostic și tratament. Un accent important trebuie pus pe depistarea precoce a tumorilor, în mod special la pacienții cu risc crescut, dar și cunoașterea procesului de carcinogeneză și elaborarea unor tratamente moderne. Importanța studiului particularităților moleculare ale HNSCC într-un proiect de cercetare este ghidată de urmărirea instituirii unui diagnostic corect, de acuratețe și implementarea unei potențiale terapii de tratament moderne.

Scopul acestei lucrări reprezintă studiul particularităților moleculare ale HNSCC, analiza celor mai importanți markeri tumorali cu implicație în prognostic, diagnostic și potențialul terapeutic. Statisticile au demonstrat un impact individual, social și economic al managementului diagnostic și terapeutic în HNSCC ce necesită studii suplimentare imunohistochimice în domeniu.

MATERIAL ȘI METODĂ

Sensibilitatea și specificitatea crescută a metodelor de analiză, diagnosticare, studiere histopatologică, histochimică și imunohistochimică în depistarea atât a leziunilor precanceroase cât și a celor maligne a reprezentat punctul de plecare în elaborarea acestui studiu de cercetare.

Pacienții și prelucrarea probelor. Probele au fost prelevate de la un număr total de 67 de pacienți (doar 50 de pacienți au fost incluși în studiu) în vederea cercetării în cadrul Departamentului II Morfologie Microscopica, Disciplina de Histologie a Universității de Medicină și Farmacie Victor Babeș Timișoara

(UMFVBT), în colaborare cu Centrul de Cercetare în Angiogenează Timișoara. Prealabil a fost obținut consimțământul informat al pacienților, au fost respectate principiile Declarației de la Helsinki, iar studiul a fost aprobat de către Comisia de Etică a Cercetării Științifice din cadrul UMFVBT nr. 22/Septembrie 2019. Probele tumorale fixate în formol și incluse în parafină au fost tranșate în secțiuni de 4 μm grosime, iar secțiunile au fost pregătite pentru colorarea cu hematoxină și eozină, ulterior pentru analiza imunohistochimică. Probele au fost analizate histopatologic și clasificate conform sistemului Broder, astfel încât criteriul de includere al pacienților în studiu a fost diagnosticul histopatologic de carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (n=50).

Metode morfologice. Diagnosticul histopatologic de HNSCC a fost stabilit în urma colorării secțiunilor cu hematoxină eozină. Colorarea morfologică, s-a realizat cu ajutorul automatului Leica Autostainer XL (Leica Biosystem Newcastle Ltd, Balliol Business Park West, Benton Lane, New Castle Upon Tyne NE 12 EW, United Kingdom). La finalul colorării, lamele au fost montate cu ajutorul automatului Leica CV Mount (Leica Biosystem Newcastle Ltd, New Castle Upon Tyne NE 12 EW, United Kingdom). Preparatele colorate morfologic au fost evaluate și selectate cazurilor de SCC pentru colorațiile histochemice și imunohistochemice.

Metode imunohistochemice. Cazurile selectate au fost colorate prin reacții simple, cu ajutorul următorilor anticorpi primari: E-caderina, Ki-67, Podoplanina, S100 și CD1a. Automatul utilizat în vederea tehnicii imunohistochemice a fost Leica Bond- Max (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Pentru demascare au fost folosite Bond Epitope Retrieval Solution 1 și 2, soluții cu pH 6 și 9 (Leica Biosystems, Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne NE 12 8EW, UK). Pentru blocarea peroxidazei endogene s-a folosit timp de 5 minute, apă oxigenată 3%. Următoarea etapă a fost incubarea cu anticorpii primari, pe o durată de 30 de minute. Anticorpii secundari și terțiari au acționat timp de 8 minute fiecare. Vizualizarea a fost realizată cu ajutorul sistemului Bond Polymer Refine Detection System. Acesta a inclus: Peroxide block (30 ml), peroxid de hidrogen 3%; Post Primary Rabbit anti mouse IgG (10 μg/mL) în soluție tamponată trifosfat sodic 10% (v/v) conținând ser animal și 0.09% ProClin 950; Polymer (30 ml) Anti-rabbit Poly-HRP-IgG (25μg/ml) în soluție tamponată trifosfat sodic 10% conținând ser animal și 0.09% ProClin 950; DAB Part 1 (2.4 ml) 66 mM 3.3 diaminobenzidina tetrahydroclorid hidrat, în soluție de stabilizare; DAB Part B (30 ml), ≤0.1% (v/v) peroxid de hidrogen în soluție de stabilizare; DAB Part

B(30 ml), $\leq 0.1\%$ (v/v) peroxid de hidrogen în soluție de stabilizare; Hematoxylin (30ml) $< 0.1\%$. Incubarea cu cromogenul DAB (3,3 diamino-benzidină) a fost de 10 minute. Contra colorarea s-a realizat cu hematoxină, timp de 5 minute. A urmat introducerea secțiunilor în alcool absolut timp de 5 minute, uscarea acestora și clarefierea în benzen pentru alte 5 minute. Montarea a fost realizată în mod automat Leica CV Mount, cu ajutorul unui mediu de montare permanent, de tipul Entellan.

Metode de cuantificare. Din punct de vedere imunohistochimic, au fost incluse cazurile care au prezentat în structurile normale expresie citoplasmatică (S100, CD1a, Podoplanina), membranară (E-caderina) și nucleară (Ki-67). Examinarea secțiunilor s-a efectuat cu microscopul fonic (MF) Nikon Eclipse 600. Analiza și prelucrarea imaginilor a fost făcută cu ajutorul microscopului Axiocam 506 color, Zeiss, Jena, Germania. Evaluarea și efectuarea imaginilor digital a fost realizată cu ajutorul sistemului Panoramic Viewer (3D Histech, Budapest Hungary).

REZULTATE

Proliferarea celulară se numără printre cei mai importanți factori implicați în procesul biologic al ontogenezei. În ultimii ani, s-au înregistrat progrese semnificative în dezvoltarea unui număr de anticorpi asociați cu factorii de proliferare. În HNSCC, Ki-67 este cel mai utilizat factor de proliferare celulară. Am efectuat un studiu privind pierderea E-cadherinei și implicarea ratei de proliferare tumorală Ki-67 în HNSCC prin metode imunohistochimice (IHC) pentru a evalua rolul lor ca markeri predictivi ai proliferării tumorale, agresivității și metastazelor ganglionare limfatice. Chiar dacă acești markeri sunt studiați separat, considerăm că este necesar un studiu privind corelația lor în ceea ce privește pierderea expresiei imunohistochimice a E-cadherinei care se corelează cu o rată de proliferare ridicată în HNSCC. Gradul histopatologic de diferențiere tumorală ar trebui investigat împreună cu indicele proliferativ Ki-67 și cu markerul ECAD pentru a lua în considerare rezultatele globale, pentru a trage concluzii cu privire la evoluția clinică și pentru a stabili o terapie țintită.

Am observat că din 50 de cazuri, 18% au prezentat pierderea expresivității ECAD, respectiv 82% din tumorile primare au avut expresia ECAD ridicată, IRS>10. Expresia ECAD ridicată a fost asociată cu gradul histopatologic predominant de

diferențiere G3, acest lucru se datorează și numărului total ridicat de pacienți diagnosticați cu gradul de diferențiere G3 (25 de cazuri), rezultând o corelație semnificativă ($p < 0,5$; $p = 0,0305$). Nu s-a observat nicio asocieră între expresia ECAD și sexul pacienților ($p < 0,5$; $p = 0,6540$), dar incidența crescută a bărbaților (42 de cazuri) comparativ cu numărul redus de femei care au dezvoltat HNSCC (8 cazuri) corespunde factorilor de risc epidemiologic, datelor și studiilor din literatura de specialitate.

Pozitivitatea imunoexpresiei Ki-67 a fost observată în toate cele 50 de probe analizate. Procentul de celule proliferative Ki-67 pozitive în tumori a variat de la 2% la peste 75%, cu o medie de 45-50%. Tumorile cu mai puțin de 10% de celule pozitive au fost clasificate ca având o rată de proliferare (PR) scăzută, în timp ce tumorile cu 11-50% și peste 50% de celule pozitive au fost definite ca având o PR medie și, respectiv, ridicată. 11 tumori (22%) au avut o PR scăzută, 21 (42%) medie și 18 (36%) o PR ridicată. Majoritatea tumorilor cu grad de diferențiere G1 au avut un indice de marcarea $< 50\%$, în timp ce la gradul de diferențiere G2, G3 s-a observat un indice de marcarea $\geq 11\%$. Au existat corelații semnificative între expresia tumorală Ki-67 și gradul histologic al tumorii ($p = 0,0245$), demonstrând în mod clar importanța IHC în evaluarea valorilor predictive ale HNSCC și a prognosticului tumoral. Indicele de proliferare celulară a fost corelat pozitiv cu gradul de diferențiere celulară și a fost mai mare în cazurile moderat/slab diferențiate, fiind de un real ajutor în stabilirea unei terapii. Această constatare confirmă ideea că, cu cât SSC este mai nediferențiat, cu atât este mai slab controlul procesului de diviziune celulară și cu atât proliferarea este mai mare. Această evaluare a arătat semnificația statistică între corelația gradului de diferențiere al tumorii și indicele de proliferare celulară ($p = 0,0245$).

În ultimii ani, tratamentele împotriva cancerului se bazează pe capacitatea sistemului imunitar de a recunoaște și elimina celulele cancerigene. Capacitatea celulelor dendritice (DCs) stă la baza generării răspunsurilor imune anti-tumorale. Astfel, am utilizat doi importanți markeri, expresia proteinei S100 și CD1a, în detecția DCs în cazurile de HNSCC studiate. Evaluarea imunohistochimică a expresiei proteinei S100 a evidențiat prezența DCs în 42% din cazuri, cu număr variabil de la o tumoră la alta. Pe baza analizei DCs, probele au fost împărțite în grupuri în funcție de scorul de evaluare și corelate cu gradația histologică. Corelația dintre expresia proteinei S100 de către DCs cu gradația histologică a fost semnificativă ($p < 0,05$,

$p=0,049$). Evaluarea imunohistochimică a CD1a a evidențiat DCs pozitive în 72% din cazurile de HNSCC. Numărul de DCs pozitive în țesutul tumoral a crescut odată cu scăderea gradului histologic. În plus, corelația dintre expresia CD1a și gradația histologică a fost puternic semnificativă ($p<0,05$, $p=0,016$). Cele mai multe dintre tumorile cu grad de diferențiere G3 au avut un scor +1 pentru S100 (8 cazuri) și CD1a (13 cazuri). Tumorile cu perle de cheratină au prezentat o densitate de DCs pozitive pentru proteina S100 și expresia CD1a. În plus, studiul de față nu a constatat o asociere între numărul de DCs intratumorale și peritumorale.

De-a lungul anilor, expresia Podoplaninei a arat un rol esențial ca marker de prognostic în cancerul scuamocelular. Astfel, am efectuat în studiul de față o dublă colorație IHC, utilizând doi importanți markeri, Podoplanina și Ki-67, utilizați în prognosticul cancerului. Rezultatele arată o corelație semnificativă între imunoexpresia PDPN și clasificarea histopatologică ($p<0,05$; $p=0,037$). Scorul mediu al densității microvaselor limfatice (LMVD) a fost calculat folosind 3 câmpuri consecutive cu mărire MFx200. Am constatat că LMVD medie este mai mare în zona peritumorală în scorul de clasificare G3 (scor maxim 13,66x200 MF), decât în zona intratumorală (scor minim 0,66x200 MF). Am corelat LMVD cu elementul de prognostic convențional (gradația histologică a cazurilor), având în vedere posibila implicare prognostică a LMVD în HNSCC. Nu am obținut o corelație semnificativă statistic cu gradul tumoral ($p<0,05$; $p=0,577$), dar a existat o corelație semnificativă cu scorul PDPN ($p<0,05$; $p=0,007$). În acest studiu, datorită dublei colorații Ki-67/PDPN, am găsit 15 probe de țesut cu invazie limfovasculară (LVI), care au fost luate în considerare pe întreaga probă de țesut tumoral. Nu am găsit diferențe majore între LVI peritumoral și intratumoral și nu a existat o corelație semnificativă între LVI și clasificarea histologică ($p<0,05$; $p=0,976$) sau proliferarea tumorală evaluată prin expresia Ki-67 nu a fost relevantă ($p<0,05$; $p=0,413$). Evaluarea imunohistochimică a colorației nucleare Ki-67 efectuată în dublă colorație cu PDPN, a fost observată în toate cele 50 de cazuri. Un indice de proliferare Ki-67 crescut a fost prezent în 82% din zonele tumorale, existând o corelație statistică între acesta și gradația histologică ($p<0,05$; $p=0,050$). În plus, am înregistrat o corelație semnificativă din punct de vedere statistic între expresia Ki-67 și expresia PDPN ($p<0,05$; $p=0,028$).

CONCLUZII

Carcinomul scuamocelular de cap și gât (HNSCC) reprezintă o importantă problemă de sănătate la nivel mondial datorită incidenței în creștere și a impactului, uneori, mutilant lăsat asupra pacientului fie din punct de vedere fizic, fie psiho-social. Considerăm necesar acest studiu prin abordarea și analiza markerilor de detecție tumorală, cu rol prognostic și terapeutic al HNSCC. Totodată am subliniat importanța particularităților moleculare ale carcinoamelor de cap și gât cu rol în tratamentul ghidat pe baza profilului tumoral.

Expresia imunohistochimică a E-cadherinei (ECAD) și Ki-67 sunt potențiali markeri predictivi ai HNSCC. În studiul nostru, indicele de proliferare Ki-67 și expresia ECAD s-au dovedit a fi caracteristici importante ale HNSCC. Astfel, markerul de proliferare tumorală Ki-67 mai mare se corelează cu pierderea expresiei imunohistochimice ECAD, ceea ce indică un prognostic mai slab al pacienților. Mai mult, această corelație importantă este asociată cu o rată mai mare de recidivă și de metastaze ganglionare limfatice.

Asocierea celulelor dendritice (DCs) cu clasificarea histologică și infiltrarea lor intratumorală sugerează rolul lor antitumoral, iar expresia imunohistochimică CD1a, a prezentat corelație puternic semnificativă, reprezintă un marker util cu potențial prognostic și terapeutic în carcinomul cu celule scuamoase de cap și gât. Pe de altă parte, acest studiu a demonstrat că expresia dublei imunocolorații Ki-67/Podoplanina s-a corelat cu gradul histopatologic al HNSCC, sugerând că acești markeri sunt de încredere în utilizarea clinică ca și prognostic al pacienților cu cancer. Rezultatele studiului actual susțin importanța dublei colorări (Ki-67/Podoplanina) în determinarea limfangiogenezei tumorale, sporind precizia diagnosticului și a prognosticului pentru pacienții cu HNSCC.

Concluzionăm că markerii imunohistochimici reprezintă instrumente importante care contribuie la diagnostic, evaluează cursul probabil al bolii și prezic răspunsul la tratament; astfel, aceștia necesită introducerea în utilizarea curentă în practica clinică. De asemenea, studiul nostru a demonstrat impactul semnificativ asupra diagnosticului și prognosticului HNSCC. O altă caracteristică importantă ce am demonstrat în această lucrare este implicarea acestor markeri IHC în potențiale terapii viitoare țintite, și în personalizarea tratamentului aplicat pacientului cu HNSCC.