

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL XII – OBSTETRICĂ ȘI GINECOLOGIE**

**BĂLAN LAVINIA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**ASPECTE CELULARE, MOLECULARE ȘI  
CLINICOPATOLOGICE IMPLICATE IN DEZVOLTAREA  
CANCERULUI CERVICAL ȘI INTERRELAȚIA LOR CU  
MICROMEDIUL TUMORAL**

**– R E Z U M A T –**

**Coordonator științific:**

**PROF. UNIV. DR. PIRTEA LAURENȚIU**

**T i m i ș o a r a  
2 0 2 4**



## PARTEA GENERALĂ

### INTRODUCERE

Cancerul de col uterin este al patrulea cel mai răspândit cancer în rândul femeilor la nivel global, după cancerul de sân, colorectal și pulmonar (1). În România, aproximativ 3 400 de femei sunt diagnosticate cu această boală anual, înregistrându-se peste 1 800 de decese. Țara noastră se situează pe locul al doilea în ceea ce privește incidența cancerului cervical și mortalitatea în rândul țărilor UE (2,3).

Detectarea și tratarea leziunilor precursorare este esențială pentru prevenirea cancerului de col uterin invaziv, deoarece are o perioadă lungă de timp de dezvoltare.

Introducerea testului Papanicolau în 1940 a revoluționat diagnosticul modificărilor morfologice ale epiteliului cervical, având ca rezultat o scădere semnificativă a prevalenței cancerului cervical în țările industrializate (4). Agenția Internațională pentru Cercetare în Domeniul Cancerului (IARC) recomandă ca programele de screening pentru cancerul cervical care utilizează testul Papanicolau să fie efectuat la intervale de trei până la cinci ani pentru femeile cu vârste cuprinse între 35 și 64 de ani, fapt ce ar reduce cancerul cervical invaziv cu cel puțin 80% (4). Principala cauză a cancerului de col uterin este infecția cronică cu tulpini de HPV cu risc ridicat.

Cancerul de col uterin este mai răspândit în rândul femeilor cu proveniență din medii socioeconomice scăzute din cauza lipsei educației sexuale și a numărului crescut de parteneri sexuali. Fumatul crește riscul de cancer de col uterin de două ori în comparație cu nefumătorii. De asemenea, imunosupresia cronică, transplantul de rinichi sau infecția cu HIV crește riscul (3,5).

Prognosticul cancerului de col uterin este determinat de severitatea bolii la diagnosticare, inclusiv stadiul tumorii, tipul histologic, gradul, volumul tumorii și profunzimea invaziei (5).

Testele Papanicolau și HPV sunt utilizate în prezent pentru screening-ul cancerului de col uterin, dar diagnosticul definitiv este obținut prin biopsie țintită sau conizația colului uterin cu examinare histologică.

Persoanele cu boli cronice subiacente, cum ar fi cancerul, sunt mai vulnerabile la infecția cu sindromul respirator acut sever (SARS-COV-19). În timpul fazelor incipiente ale pandemiei de COVID-19, s-a înregistrat o scădere semnificativă a identificării mai multor forme de cancer (6, 7), cu un procent tot mai mare de diagnosticare a cancerelor în stadii avansate (8).

Acest efect negativ a fost cauzat de deficiențe ale sistemelor de sănătate, o lipsă de pregătire și de disponibilitate a resurselor, precum și de o creștere a numărului de cazuri de COVID-19, în care cererea pentru testarea SARS-CoV-2 concurează cu capacitatea de a furniza teste HPV (8), la care se adaugă o lipsa de personal medical (9).

Cercetătorii s-au concentrat asupra celulelor tumorale ca țintă principală pentru terapii.

Stroma tumorală (TSR) este o parte esențială a micromediului tumoral, cuprinzând fibroblaști, matrice extracelulară, capilare și celule inflamatorii. Acesta joacă un rol semnificativ în dezvoltarea cancerului, progresiei, metastazării și rezistenței la tratament (10). Micromediul peritumoral este esențial pentru formarea tumorilor și pentru dispersia celulară. Invazia tumorală are loc într-o microecologie tumorală-gazdă, în care celulele stromale și tumorale își schimbă enzime și citokine. Stroma susține celulele canceroase (11, 12).

TSR este o metodă utilă și valoroasă pentru anatomopatologi pentru a obține informații cu utilitate apoi din punct de vedere clinic din lamele bioptice colorate cu HE hematoxilin-eozină. Raportul stromei tumorale trebuie evaluat în timpul examinării

morfopatologice inițiale a specimenelor obținute post-intervenție chirurgicală pentru un diagnostic cu o sensibilitate mai mare.

Interrelația dintre tumoră-stromă este o problemă foarte discutată în ultima vreme, nu numai în cancerul de col uterin, ci și în alte tipuri de neoplazii. Cu toate acestea, valoarea lor predictivă în prognosticul cancerului de col uterin nu este bine cunoscută.

Studiul stromei tumorale a oferit multe oportunități pentru terapiile viitoare ale cancerului. Componentele țintă ale micromediului tumoral au un potențial clinic imens, în special atunci când sunt combinate cu alți agenți terapeutici.

Metastazele ganglionilor limfatici (LNM) reprezintă o formă comună de cancer de col uterin care are un impact semnificativ asupra evoluției pacientelor. Pacienții cu LNM pozitiv au o rată de supraviețuire de 5 ani semnificativ mai proastă comparativ cu cei fără metastaze (91 %) (13).

Biopsia ganglionilor limfatici sentinelă (SLN) se efectuează deoarece acesta este primul loc de metastază tumorală, iar patologia sa ar trebui să reflecte boala metastatică în alți ganglioni limfatici. Metodologia ultrastaging și procesarea țesuturilor sunt componente cruciale ale adoptării ganglionului sentinelă în cancerul de col uterin. Cercetările au arătat că ultrastaging-ul SLN poate identifica cu 10% până la 15% mai mulți pacienți cu micrometastaze (MIC), cu un impact negativ similar (14).

Tehnica de ultrastaging pentru clasificarea cancerului de col uterin a fost încorporată în practica standard și menționată în ghidurile de tratament recunoscute la nivel internațional. Diverse substanțe de urmărire, cum ar fi albastru de metilen-tehnețiu (TMEB) și verde de indocianină (ICG), au fost sugerate pentru detectarea ganglionilor sentinelă pentru a crește eficacitatea acestuia. S-a demonstrat că ultrastagingul SLN crește valoarea predictivă negativă de la 91% cu până la 100% (15,16).

## **II. PARTEA SPECIALĂ**

### **1. MOTIVAȚIA CERCETĂRII**

Interrelația dintre tumoră și stromă este o problemă semnificativă în cancerul de col uterin și în alte tipuri de neoplazii. Epiteliul colului uterin se dezvoltă îndeaproape cu semnalele moleculare primite de la mezoderm și țesutul conjunctiv în timpul perioadei embrionare. Această interrelație este bine controlată în condiții normale, dar dezechilibrele pot cauza condiții patologice.

Stroma cervicală are caracteristici unice, cum ar fi componentele celulare dependente de hormoni, în principal fibroblaștii, care reacționează la transformarea malignă a celulelor epiteliale. Raportul tumoră-stromă este un criteriu din ce în ce mai important în evaluarea tumorilor cervicale, cu un impact clinic și terapeutic major.

Fibroblastele din stroma tumorii pot sintetiza factori care determină și susțin perpetuarea transformării maligne a celulelor epiteliale și acționează asupra altor componente stromale adiacente fibroblaștilor hiperplazici. Fibroblaștii asociați cancerului (CAF) reprezintă un alt aspect al fibroblaștilor în leziunile maligne, mai multe tipuri fiind descrise în funcție de variabilitatea lor moleculară. Aceste tipuri moleculare s-au dovedit a fi specifice anumitor forme moleculare de cancer de sân.

Se presupune că heterogenitatea moleculară a fibroblaștilor stromali este prezentă în cancerul de col uterin, dar acest lucru nu a fost certificat până în prezent. Există date limitate în literatura de specialitate cu privire la modul în care anumite componente ale stromei tumorale, cum este infiltrația limfatică, au fost corelate cu parametrii paraclinici, cum este numărul de leucocite din sângele periferic la momentul diagnosticului și după tratament. Acest studiu urmărește să asocieze infiltratul limfoid

difuz sau structurile limfoide terțiare (TLS) cu leucocitele din sângele periferic, atât în tumora primară, cât și în leziunile limfoide metastatice.

Raportul tumoră/stromă studiat în tumora primară va fi apoi corelat cu prezența sau absența ganglionilor limfatici pentru a identifica impactul stromei asupra procesului de metastazare. Un alt aspect extrem de important al stromei tumorale care afectează transformarea malignă a celulelor epiteliale este compartimentul vascular. Invasia limfovaculară este un parametru care este prezentat de către anatomopatolog la momentul stabilirii diagnosticului histopatologic primar, dar nu este un criteriu pentru alegerea metodelor terapeutice și medicamentoase.

Histiocitoza sinusală observată în ganglionii limfatici, cu sau fără metastaze, este, de asemenea, un subiect care nu a fost studiat în literatura de specialitate. În prezent, nu se cunoaște ce impactul prognostic și terapeutic are histiocitoza sinusală în cancerul de col uterin cu metastaze la nivelul ganglionilor limfatici, iar acest aspect va fi studiat în lucrarea de față prin corelarea prezenței sau absenței histiocitozei sinusale în ganglionii limfatici cu raportul tumoră-stromă din tumora primară și metastazele limfatice. În același timp, atât la nivelul stromei cervicale cât și la nivelul compartimentului vascular, impactul radioterapiei asupra cancerului de col uterin este, de asemenea, controversat. Există indicii că radioterapia va determina o reacție inflamatorie pronunțată la nivelul colului uterin, urmată de o hiperactivitate a procesului angiogenic de formare a unor vase de sânge noi, care poate promova în continuare răspândirea celulelor tumorale, în timp ce impactul radioterapiei asupra fibroblaștilor stromali este necunoscut, în ciuda efectului său citotoxic asupra celulelor epiteliale maligne.

Infecția cu SARS CoV2 este extrem de puțin evaluată în ceea ce privește impactul său asupra dezvoltării, progresiei și metastazării cancerului de col uterin. Date indirecte despre impactul SARS CoV 2 asupra modificărilor micromediului imunitar al cancerului de col uterin sau a mediului imunitar general al femeilor, cu impact direct asupra unei posibile modificări a dinamicii dezvoltării cancerului de col uterin.

Predicția metastazelor cervicale la nivelul ganglionilor limfatici este esențială pentru îmbunătățirea ratei de supraviețuire și reducerea recurenței. Foarte puține studii au utilizat o metodă de ultrastaging pentru a evalua ganglionii limfatici non-sentinelă (non-SLN); majoritatea au evaluat doar ganglionii limfatici sentinelă (SLN). Acest studiu a avut ca scop evaluarea tuturor ganglionilor limfatici sentinela (SLN) și non-SLN, la pacientele cu cancer de col uterin și risc ridicat de imfiltrare limfatică, dar cu ganglionii limfatici negativi la evaluarea anatomopatologică intraoperatorie, pentru a crește sensibilitatea și acuratețea diagnosticului în cancerul de col uterin cu o urmărire de 5 ani a pacientelor incluse în studiu.

Toate aceste motive descrise mai sus au stat la baza prezentului studiu.

## 2. OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE

- Identificarea factorilor cu valoare de prognostic și predicție pentru dezvoltarea, progresia și metastazarea cancerului de col uterin prin utilizarea metodelor de cercetare de bază corelate cu parametrii clinico-patologici
- Evaluarea raportului tumoră/stromă în tumora primară și impactul său asupra parametrilor clinic
- Impactul radioterapiei asupra raportului stromului tumoral.
- Evaluarea infiltratelor inflamatorii și a structurilor limfoide terțiare (TLS) și a interacțiunii acestora cu nivelurile leucocitelor din sângele periferic
- Identificarea țintelor terapeutice comune exprimate atât în celulele epiteliale cât și în stromă, PDGF, PDGFR, cd 34, Hpv.

- Caracterizarea heterogenității celulare în stroma tumorală: Fibroblaști/ Miofibroblaști
- SLT (extractor limfoid terțiar) / infiltrat inflamator invazie limfovasculară pe piesa cervicală
- Evaluarea raportului nave/stromă
- Impactul perioadei de pandemie SARS COV-2 în diagnosticarea și dezvoltarea cancerului de col uterin
- Acuratețea ultrastagingului în detectarea micrometastazelor în ganglionii limfatici santinelă și non-santinelă în cancerul de col uterin

### III. REZULTATE

#### 1. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: PARTICULARITĂȚILE IMUNE ALE STROMEI CANCERULUI DE COL UTERIN, CU ACCENT SPECIAL PE STRUCTURA LIMFOIDĂ TERȚIARĂ ȘI CORELAREA CU PARAMETRII CLINICO-PATOLOGICI

Studiul nostru investighează variantele morfologice ale structurilor limfoide terțiare (TLS) în relație cu dezvoltarea cancerului cervical, de la leziuni preneoplazice intraepiteliale la carcinoame invazive și metastaze la nivelul ganglionilor limfatici locoregionali.

**Materiale și metode:** Această analiză retrospectivă a cuprins 100 de cazuri de cancer de col uterin la care s-a efectuat o histerectomie totală cu limfadenectomie în cadrul Clinicii de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Clinic Municipal de Urgență Timișoara, România, în perioada 2020-2023. Limfadenectomia bilaterală ilio-obturatoare și histerectomia totală au fost utilizate pentru a obține probele bioptice. Prezența centrelor germinale, a structurilor stromale, densitatea TLS, localizarea față de leziunile tumorale și insulele celulare maligne sunt utilizate pentru evaluarea și clasificarea SLT.

**Rezultate:** La început am evaluat numărul total de TLS (TLS.T). Am observat topografic două localizări în stroma cervicală: TLS poziționat imediat peritumoral și TLS la distanță de leziunile tumorale. Carcinoamele invazive au TLS superficiale mai mari cu un centru germinativ bine definit. Pe măsură ce s-au apropiat de tumoră, TLS au crescut în dimensiune și densitate. De asemenea, am detectat un tip special de TLS asociat cu fibrele nervoase, pe care le-am numit structuri limfoide terțiare asociate cu nervii (TLS.N). Numărul total de TLS.T nu s-a corelat cu vârsta, dar 85,71 % dintre pacientele care au prezentat TLS.N au avut vârsta cuprinsă între 59 și 72 ani. Rezultatele noastre au indicat o strânsă corelație între vârstă (postmenopauză,  $p = 0,005$ ) și prezența TLS.N.

În mod similar, parametrii TLS au evoluat o dată cu diferențierea tumorii. Doar în grupul TLS.N s-a corelat cu scorul tumoral (G)- 3 ( $p = 0,041$ ), în timp ce SLT.T nu s-a corelat cu G. Toate pacientele TLS.N., cu excepția uneia, au avut invazie limfovasculară și histiocitoză masivă. În primul rând TLS.N s-a corelat cu invazia limfovasculară ( $p = 0,032$ ).

**Concluzie:** Structurile limfoide terțiare asociate cu nervii nu au fost raportate anterior în cancerul de col uterin, iar efectele lor asupra prognosticului și agresivității sunt necunoscute. A existat o corelație semnificativă între prezența TLSs.N și vârsta de peste 60 de ani, sugerând că acesta posibil să apară exclusiv la femeile în menopauză. Au fost descoperite corelații între invazia limfovasculară și G3, sugerând că acestea ar putea fi un factor de prognostic slab al cancerului de col uterin.

## **2. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: IMPACTUL PANDEMIEI DE SARS-COV-2 ASUPRA DIAGNOSTICULUI CANCERULUI DE COL UTERIN ȘI AL LEZIUNILOR PRECURSOARE - UN STUDIU RETROSPECTIV UNICENTRIC**

În acest studiu obiectivul nostru a fost să conducem o analiză retrospectivă a volumului testelor de screening cervical, a numărului de paciente tratate printr-o metodă de excizie și a incidenței efectelor leziunilor cervicale invazive și premaligne în timpul unei perioade pandemice și pre-pandemice de 24 de luni.

**Materiale și metode:** Studiul a inclus 404 paciente care au fost supuse unei biopsii de col pentru diagnosticul cancerului de col uterin. Studiul a examinat speciemenle bioptice ale pacientelor pe baza caracteristicilor histopatologice și a clasificat leziunile cervicale pe baza rezultatelor testului Papanicolau.

**Rezultate:** a existat o diferență de vârstă semnificativă din punct de vedere statistic între cele două perioade de studiu. Diferența de vârstă a fost cu o medie de 32 ani înainte de apariția pandemiei și de 35 ani în timpul pandemiei (valoarea  $p > 0,05$ ). Cea mai mare scădere în prezentarea pentru screening a pacientelor identificată pe grupe de vârstă a fost în grupul de 50-59 ani, cu o scădere de 14,53 % în perioada pre-pandemie și o scădere de 9,1 % în perioada pandemică. În perioada pandemică, pacientele din zonele rurale au prezentat în studiul clinic o rată mai mică, de 39,52 % (83 paciente) față de 60,47 % (127 paciente) în zonele urbane. Un procent mai crescut de paciente au prezentat sângerare cervicală ca primă manifestare clinică în perioada pandemică, comparativ cu perioada pre-pandemică, cu o creștere a numărului de leziuni cervicale mai severe în perioada pandemică, a avut o semnificație statistică cu 8 % mai mare decât perioada pre-pandemică.

**Concluzii:** adresabilitatea pacientelor în timpul perioadei COVID nu a fost afectată în mod drastic în studiul nostru. Am înregistrat o scădere a numărului de programări pentru screening la grupa de vârstă de 50-59 de ani și o scădere a numărului de paciente cu reședința în mediul rural. În studiul nostru, am găsit o creștere a sângerării cervicale ca motiv de consultare în perioada pandemică cu un grad mai mare de leziune cervicale, atât pe un frotiu de examen citologic Papanicolau, cât și pe o biopsie cervicală.

## **3. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: INFLUENȚA RECIPROCĂ A INTERACȚIUNII TUMORALE TUMORALE DIN CANCERUL DE COL UTERIN- EVALUAREA STROMEII PRIN EXPRESIA RECEPTORULUI-BETA A PDGF-BB ȘI PDGF-BETA**

În acest studiu scopul nostru a fost de a evalua relația dintre expresia factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF) în celulele tumorale și expresia receptorului stromal tumoral, precum și efectele supraexpresiei PDGF asupra angiogenezei și limfangiogenezei stromale.

**Materiale și metode:** Studiul a fost efectuat pe țesut colectat de la nivelul colului uterin prin biopsii țintite din leziuni macroscopice perceptibile, piese de conizație și material biptic postoperator al pacientelor cu leziuni intraepiteliale premaligne și leziuni invazive. Am efectuat un studiu retrospectiv care a inclus 46 de specimene diagnosticate cu cancer de col uterin, arhivate și încorporate în parafină, selectate în acest scop.

**Rezultate:** În epiteliul cervical cvasi-normal adiacent tumorilor cervicale, expresia factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF-BB) a fost heterogenă, cu o scăderea expresiei de la nivelul bazal și la nivelul superficial al țesutului scuamos. Cea

mai mare intensitate a expresiei a fost înregistrată în stratul bazal, unde PDGF-BB a avut o expresie intensă.

Expresia PDGF în celulele stromale a fost mai mare decât expresia markerilor prin celulele neoplazice transformate. PDGF-BB, PDGFR-alfa și beta au fost exprimate în celulele tumorale la 41 (89,1 %), 25 (54,35 %) și, respectiv, 46 (100 %).

În leziunile de tip CIN 3, precum și în leziunile microinvazive, PDGFR-alfa a fost exprimat extensiv în zona epitelială malignă, cu o creștere în celulele expuse la stroma tumorală. De asemenea, receptorul beta a fost intens exprimat în leziuni de CIN 3. Emboliile tumorale din leziuni invazive au prezentat expresii divergente ale PDGFR-alfa și beta-expresiei în sensul că emboliile tumorale au avut un rezultat pozitiv crescut pentru PDGFR-beta și un rezultat negativ pentru PDGFR-alfa.

Evaluarea PDGF pentru cancerul microinvaziv. În studiul nostru expresia markerilor de masă tumorală nu a fost detectată în 6,25 % dintre cazuri. Expresia scăzută a fost atinsă în 31,25% din cazuri, cea moderată în 43,75% din cazuri și cea puternică în 18,75% din cazuri. În leziunile de carcinom preinvaziv, expresia PDGF a fost mai pronunțată în zona masei epiteliale bazale, în special în zona microinvaziei.

O altă etapă a studiului nostru a fost evaluarea microdensității vasculare și limfatice a stromei tumorale adiacente din cazurilor incluse în studiu. Microdensitatea vasculară sanguină (MVD) a variat între 20-84 vase de sânge/câmp microscopic x 200 cu o medie de 41,78 vase de sânge. Nu s-a găsit nicio corelație între expresia beta a PDGF și PDGF-R și MVD. Expresia alfa a PDGFR s-a corelat atât cu MVD, cât și cu LMVD (microdensitate vasculară limfatică) ( $p < 0,036$  și, respectiv, 0,05). S-a constatat o corelație semnificativă între expresia beta a PDGFR și LMVD atât intrautumoral, cât și peritumoral ( $p < 0,045$  și, respectiv, 0,032).

Concluzii: Rezultatele noastre sugerează că PDGF mediază interacțiunea celulelor canceroase cu fibroblaștii asociați cancerului, promovând proliferarea celulelor canceroase într-un mod paracrin. Acest lucru are implicații pentru tratamentul inovator combinat al cancerului.

#### **4. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ: FEZABILITATEA ȘI ACURATEȚEA ULTRASTAGINGULUI ÎN DETECTAREA MICROMETASTAZELOR ÎN GANGLIONII LIMFATICI SANTINELĂ ȘI NON-SANTINELĂ ÎN CANCERUL DE COL UTERIN: UN STUDIU RETROSPECTIV UNICENTRIC CU O PERIOADĂ DE URMĂRIRE DE CINCI ANI**

Acest studiu a avut ca scop evaluarea pacienților cu cancer de col uterin prin ultrastagingul tuturor ganglionilor limfatici (LN), ganglion sentinelă (SLN) și a ganglionilor limfatici non-SLN, pentru a crește sensibilitatea detectării metastazelor limfonodale și acuratețea diagnosticului în cancerul de col uterin cu o urmărire de cinci ani.

Materiale și metode: Acesta este un studiu retrospectiv a 14 cazuri de cancer cervical înregistrate la Spitalul Clinic Municipal de Urgență Timișoara, România din 2017 până în 2019. Cazurile au fost selectate pe baza riscului lor ridicat de invazie limfonodala, dar ganglioni limfatici intraoperator negativi. După reevaluarea tuturor mostrelor de biopsie din 29 de cazuri incluse inițial în studiu, au rămas 14 cazuri, care au îndeplinit toate criteriile pentru ultrastaging pe probele de biopsie obținute post intervenție chirurgicală.

Rezultate: Vârsta pacienților incluse în studiu a variat între 43 și 70 ani (mediană: 57,14 ani). Potrivit stadializării realizate de Federația Internațională de Ginecologie și Obstetrică (FIGO), majoritatea pacienților au fost în stadiu IB: șapte cazuri (50 %). Studiul a evidențiat o corelație pozitivă între vârsta pacienților și



stadializarea FIGO, cu un coeficient de corelație Pearson de 0,707 și o valoare p mai mică de 0,05, indicând o probabilitate mai mare ca pacientele mai în vârstă să fie diagnosticate într-un stadiu FIGO mai înalt. Urmărirea medie a fost de 34,5 luni, cu o mediană de 36 luni (interval: 6-60 luni). Am obținut 167 de ganglioni limfatici cu o medie de 11.92 ganglioni limfatici / caz. S-a constatat că douăzeci și unu de ganglioni limfatici au fost pozitivi prin metoda de ultrastaging. Am detectat 11 ganglioni limfatici cu macrometastaze (MAC) (52,38 %), șapte cu micrometastaze (MIC) (33,3 %) și trei cu insule de celule tumorale (ITC) (14,4 %). Acest lucru reprezintă 13% cazuri nou diagnosticate cu ganglioni limfatici pozitivi prin metoda de ultrastaging. Această metodă de ultrastaging a detectat MIC ganglionare la 8 (57,1 %) din cei 14 pacienți, care inițial au avut un rezultat negativ la testul de implicare a ganglionilor limfatici, folosind metoda de rutină cu hematoxilină și eozină (HE). Detectarea micrometastazelor la acești pacienți a evidențiat sensibilitatea superioară a ultrastagingului, care a fost susținută de recidiva bolii în decurs de 5 ani la 4 (28,57 %) dintre aceste opt paciente. De asemenea, studiul nu a identificat nicio corelație între standardizarea FIGO și numărul CMI constatat la aceste paciente.

Concluzii: Predictia apariției metastazelor limfatice (LNM) din cancerul de col uterin este esențială pentru îmbunătățirea ratelor de supraviețuire și reducerea recurenței. Foarte puține studii de cohortă de mici dimensiuni au utilizat o metodă de ultrastaging pentru a evalua ganglionii limfatici non-santinela (non-SLN); majoritatea au evaluat doar ganglionii sentinela. Am arătat în studiul nostru că metoda de ultrastaging, atât în cazul SLN, cât și în cazul non-SLN, este superioară în comparație cu analiza H&E, cu o rată de 13% a diagnosticării noi a limfonodurilor pozitive. Implicarea metastatică a non-NSL a fost constatată în peste 50% din toate cazurile (8/14), conform metodei de ultrastaging. În plus, studiul nostru confirmă faptul că sensibilitatea ultrastagingului SLN este ridicată atât pentru prezența MIC, cât și a MAC în SLN. Prin urmare, considerăm că ultrastagingul este cea mai eficientă metodă de analiză a SLN la pacientele cu cancer de col uterin în stadiu incipient, iar detectarea bilaterală este preferabilă, reducând semnificativ rezultatele fals-negative. Utilizarea de rutină a SLN împreună cu ultrastagingul ar duce la o mai mare acuratețe a stadializării chirurgicale și la o mai bună monitorizare oncologică a cazurilor.

#### **IV. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE**

Această teză de doctorat își propune să efectueze un studiu multidisciplinar al cancerului de col uterin care va combina aspectele microscopice cu date clinico-patologice pentru a defini noi ținte de diagnostic și terapeutice. Studiul a inclus cercetări atât clinice, cât și experimentale în contextul cazurilor selectate în timpul pandemiei de COVID-19. În acest sens, putem considera că obiectivele cercetării științifice au fost atinse și chiar depășite prin introducerea neprogramată în cercetarea științifică a impactului SARS-CoV2 asupra evoluției și prognozei cancerului de col uterin. În acest aspect original al tezei, această cercetare a depășit limitele clinice și experimentale, luând în considerare factorul social care nu a fost studiat în majoritatea leziunilor maligne. Un astfel de eveniment social, prin componentele sale, poate provoca o evoluție nefavorabilă a cancerului de col uterin numai prin prezența acestuia, crescând numărul de cazuri diagnosticate la prima prezentare a pacientului și făcând parte din categorii patologice înalte. Acest aspect, cel puțin în aria noastră geografică, poate fi considerat una dintre contribuțiile originale ale tezei noastre de doctorat.

Un alt obiectiv al studiului nostru a fost să ne concentrăm asupra stromei cancerului de col uterin. De obicei, studiul cancerului de col uterin se concentrează pe componenta epitelială malignă, de la diagnostic până la testele specifice necesare

pentru terapie și predicția prognosticului. Această teză de doctorat a avut ca obiectiv principal studierea componentele celulare ale stromei, ce nu se regăsesc în literatura de specialitate, dar care s-a descoperit recent că au un impact crescut asupra răspunsului la terapie și, într-o mai mică măsură, componenta epitelială malignă studiată în strânsă legătură cu stroma tumorală a cancerului de col uterin.

Datorită imunoterapiei ca măsură terapeutică inovatoare în diferite tipuri de malignități, inclusiv în cancerul de col uterin, am considerat util să se concentreze cercetarea științifică asupra componentei inflamatorii a cancerului de col uterin și, mai specific, asupra unei structuri care a apărut înainte sau în timpul imunoterapiei, respectiv, structurile limfoide terțiare (TLS). În acest context, ca parte originală, putem menționa identificarea pentru prima dată a unui anumit tip de TLS, și anume TLS asociat cu nervii - structura microscopică care nu a fost descrisă anterior în literatură. Am demonstrat în acest studiu o corelație semnificativă statistic între prezența acestui tip particular de TLS și parametri clinico-biologici ai pacientelor cu cancer de col uterin. Dintre acești parametri clinico-biologici, am aflat că cei mai importanți au fost invazia limfovaculară, numărul limfocitelor periferice, monocitele și vârsta. Comparativ cu vârsta, am demonstrat diferențe semnificative în prezența acestei structuri inflamatorii organizate de la stroma cervicală la stadiile de premenopauză și menopauză. Acest lucru poate fi considerat, de asemenea, un aspect de originalitate al acestei teze.

Multe terapii inovatoare sunt vizate în primul rând de familia factorilor PDGF și receptorii corespunzători, care sunt puțin studiați în cancerul de col uterin. Din acest motiv, am considerat utilă includerea în studiul nostru a celor două componente PDGF respective: ligandul PDGF-BB și receptorul PDGFR-beta. Expresia lor asupra componentei epiteliale a fost intens studiată. Prin studiul nostru, am demonstrat heterogenitatea exprimării celor doi markeri în stroma cancerului de col uterin. Acest capitol al cercetării a fost limitat la o evaluare descriptivă a tipurilor de celule stromale, în care acestea au fost pozitive inclusiv în stratul vascular. În cazul în care evaluarea TLS a vizat componenta imunologică a stromei, studiile PDGF și PDGF-R au acoperit componenta vasculară prin cei doi reprezentanți ai lor, respectiv vascularizarea sanguină și limfatică. Rezultatele studiului PDGF s-au limitat la identificarea unor corelații semnificative din punct de vedere statistic între microdensitatea sanguină și cea limfatică în stroma tumorii cervicale. Aceste corelații au sugerat indirect implicarea PDGF în stimularea vascularizării limfatice și sanguine și implicit promovarea diseminării limfovasculare locale și la distanță, comună cancerului de col uterin avansat în momentul diagnosticării.

O altă contribuție originală de remarcat în această teză a fost corelarea prezenței structurilor limfoide terțiare cu nivelurile periferice ale celulelor inflamatorii din grupul leucocitelor, în special limfocite și monocite. În legătură cu aceasta, unul dintre dezavantajele tehnice ale acestui studiu a fost imposibilitatea de a preleva probe de sânge și de a le depozita într-o bancă de țesuturi pentru utilizare ulterioară în scopul dozării factorilor serici inflamatori adiacenți care ar fi putut furniza informații suplimentare privind corelația dintre țesuturile periferice și stromale adiacente cancerului de col uterin.

Predicția riscului de metastazare la nivelul ganglionilor limfatici (LNM) din cancerul de col uterin este esențială pentru îmbunătățirea ratelor de supraviețuire și reducerea recurenței.

O contribuție originală de remarcat în această teză este faptul că, prin procedura de ultrastaging, am demonstrat o sensibilitate crescută în detectarea implicării limfonodale. Deși societățile internaționale promovează ultrastagingul în plan de tratament, acesta nu a fost încă standardizat și nu există în prezent directive disponibile pentru aplicarea metodei de ultrastaging. Studiul nostru a folosit o metodă de

ultrastaging pentru a evalua atât ganglionii limfatici sentinela cât și pe cei non- sentinela; pe când majoritatea studiilor au evaluat doar ganglionii limfatici sentinela.

Considerăm că ultrastagingul este cea mai eficientă metodă de analiză a SLN la paciențele cu cancer de col uterin în stadiu incipient, iar detectarea bilaterală este preferabilă, reducând semnificativ rezultatele fals negative.

Un alt dezavantaj tehnic și economic al prezentului studiu este interpunerea în timpul studiului pandemiei de COVID-19, care a întârziat efectuarea cercetării, dar, în special, a restricționat efectuarea cercetării fundamentale a prezentului studiu, precum și restricționarea prezentării pacienților la controalele periodice și încetarea intervențiilor chirurgicale pentru o perioadă limitată. Pe baza acestui dezavantaj tehnico-economic și nefiind un obiectiv programat, am considerat utilă introducerea capitolului privind impactul pandemiei de SARS-COV-2 asupra cancerului de col uterin în zona în care lucrăm. SARS-COV-2 ne-a oferit o nouă perspectivă asupra faptului că restricționarea accesului pacienților la screening și diagnostic duce la diagnosticarea cancerelor cervicale în stadii mai avansate, urmată de o înrăutățire a prognosticului pacientului pe termen lung.

Studiul de față, prin rezultatele sale, a deschis noi căi de cercetare în domeniu. Acesta poate fi considerat un studiu preliminar în ceea ce privește evaluarea imunitară și vasculară a stromei cervicale. Restul problemelor nerezolvate din acest studiu sunt lipsa imunofenotipării a TLS asociat nervilor și TLS clasic, pentru a observa diferențele de celularitate a limfocitelor care pot avea un impact asupra imunoterapiei în cancerul de col uterin. În plus, eșecul detectării nivelurilor serice de PDGF la paciențele cu cancer de col uterin face imposibilă obținerea unei imagini complete a impactului acestui factor de creștere asupra microdensității vasculare și limfatice, implicit asupra evaluării obiective a profilului și rapidității invaziei limfovaskulare cu un rol de prognostic imediat și la distanță. Toate aspectele importante menționate mai sus sunt direcții de cercetare viitoare pentru acest studiu.

## REFERINȚE

1. Stoler MH, Wright TCJ, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol*. 2011 Mar;135(3):468–75.
2. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):189–97.
3. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NWJ, Heideman DAM, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):78–88.
4. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* (London, England). 2014 Feb;383(9916):524–32.
5. Thrall MJ, Smith DA, Mody DR. Women  $\geq 30$  years of age with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) have low positivity rates when cotested for high-risk human papillomavirus: should we reconsider HPV triage for LSIL in older women? *Diagn Cytopathol*. 2010 Jun;38(6):407–12.
6. Force USPST. Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA* [Internet]. 2018;320(7):674–86. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.10897>
7. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis*. 2020 Apr;24(2):102–31.
8. Practice Bulletin No. 168: Cervical Cancer Screening and Prevention. *Obstet Gynecol*. 2016 Oct;128(4):e111–30.
9. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020;26(5):579–83. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19304914>
10. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Jul;28(suppl\_4):iv72–83.
  11. Palla V-V, Karaolanis G, Moris D, Antsaklis A. Sentinel lymph node biopsy in uterine cervical cancer patients: ready for clinical use? A review of the literature. *ISRN Surg*. 2014;2014:841618.
  12. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macrì L, Fiorito C, et al. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol*. 2015 Apr;123(4):212–8.
  13. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Aug;18(15):4154–62.
  14. Bergeron C, Ikenberg H, Sideri M, Denton K, Bogers J, Schmidt D, et al. Prospective evaluation of p16/Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer Cytopathol*. 2015 Jun;123(6):373–81.
  15. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134445.
  16. Secosan C, Pasquini A, Zahoi D, Motoc A, Lungeanu D, Balint O, et al. Role of Dual-Staining p16/Ki-67 in the Management of Patients under 30 Years with ASC-US/L-SIL. *Diagnostics*. 2022;12(2):403.
  17. Einstein MH, Garcia FAR, Mitchell AL, Day SP. Age-stratified performance of the Cervista HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2011 Jun;20(6):1185–9.
  18. Evans MF, Adamson CS-C, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*. 2006 Mar;106(5):1054–64.
  19. Zuna RE, Wang SS, Rosenthal DL, Jeronimo J, Schiffman M, Solomon D. Determinants of human papillomavirus-negative, low-grade squamous intraepithelial lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS). *Cancer*. 2005 Oct;105(5):253–62.
  20. Hanselaar A, van Loosbroek M, Schuurbiers O, Helmerhorst T, Bulten J, Bernhelm J. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. An update of the central Netherlands registry showing twin age incidence peaks. *Cancer*. 1997 Jun;79(11):2229–36.
  21. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000 Oct;157(4):1055–62.
  22. Mikami Y, McCluggage WG. Endocervical glandular lesions exhibiting gastric differentiation: an emerging spectrum of benign, premalignant, and malignant lesions. *Adv Anat Pathol*. 2013 Jul;20(4):227–37.