

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**



**TEZĂ DE DOCTORAT**

**ASPECTE ANATOMOCLINICE, MORFOLOGICE ȘI  
GENETICE ÎN CANCERUL DE LARINGE**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:**

**PROF. UNIV. DR. ELENA IONIȚĂ**

**STUDENT-DOCTORAND:**

**ALEXANDRU NICOLAE VLĂESCU**

**CRAIOVA**

**2020**

# **CUPRINS**

## **INTRODUCERE**

## **STADIUL CUNOAȘTERII**

**Anatomia laringelui**

**Fiziologia laringelui**

**Diagnosticul pozitiv al cancerului de laringe**

**Stadializarea cancerului de laringe**

**Tratamentul cancerului de laringe**

## **CONTRIBUȚII PROPRII**

**Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

**Metodologia cercetării**

**Rezultatele studiului**

## **CONCLUZII**

**Cuvinte cheie:** cancer de laringe, carcinom scuamos, histopatologie, imunohistochimie, genetică, Ki67, p53, PCNA, EGFR, CD44, EMA, ADN, Real-Time PCR, ATG5, p.V600E, BRAF.

## INTRODUCERE

Teza de doctorat reprezintă un studiu anatomoclinic, morfologic și genetic al cancerului de laringe, fundamentat pe date clinice și statistice din cadrul Clinicii ORL a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, desfășurat pe o perioadă de 9 ani, între 2010 și 2018, interval în care s-au evidențiat și cazuri rare de carcinom laringian, ce sunt expuse în această lucrare sub formă de cazuri clinice.

## STADIUL CUNOAȘTERII

Stadiul cunoașterii este divizat în anatomia laringelui, fiziologia laringelui, diagnosticul pozitiv al cancerului de laringe, stadializarea cancerului de laringe și tratamentul cancerului de laringe.

**Anatomia laringelui** descrie detaliat cele trei etaje: supraglotic, glotic și subglotic, precum și scheletul laringian, format dintr-o serie de cartilaje interconectate prin ligamente și membrane. În continuare este abordată amănunțit musculatura extrinsecă și intrinsecă a laringelui, vascularizația și inervația laringelui, precum și spațiile paraglotic și preepiglotic, cu o importanță deosebită în extensia tumorală. Structura corzii vocale este prezentată atât la nivel macro cât și microanatomic, prin ilustrarea teoriei “cover body” a lui Hirano.

**Fiziologia laringelui** întrunește și expune funcțiile laringelui: funcția de fonație cu exemplificarea formării vocii la nivel laringian și rolul efectul Bernoulli asupra corzilor vocale, funcția de protecție a laringelui prin deglutiție și tuse, precum și funcția respiratorie.

**Diagnosticul pozitiv al cancerului de laringe** parcurge un algoritm etapizat format din anamneză, diagnostic clinic (examinarea și palparea regiunii cervicale, laringoscopia indirectă și videolaringoscopia de contact), diagnosticul imagistic (radiologic, ultrasonografic, CT, RMN, PET-CT).

**Stadializarea cancerului de laringe** are o importanță primordială în stabilirea planului terapeutic și are la bază sistemul TNM al Organizației Mondiale a Sănătății, ce este clădit pe mărimea și extensia tumorii primare (T), prezența metastazelor ganglionare regionale (N) și a metastazelor la distanță (M).

**Tratamentul cancerului de laringe** presupune tehnici chirurgicale transorale și tehnici chirurgicale externe, stabilite în funcție de stadializarea TNM. Tehnicile chirurgicale transorale în cancerul laringian se adresează tumorilor în stadii incipiente sau intermediare de cancer glotic și supraglotic, prin cordectomie endoscopică LASER CO<sub>2</sub>. Tehnicile chirurgicale externe cuprind laringectomii parțiale, laringectomii totale, laringectomii de salvare, dar și traheotomia și evidarea ganglionară. De asemenea, în majoritatea cazurilor, tratamentul se completează și cu un tratament oncologic radio-chimio-terapic.

## **CONTRIBUȚII PROPRII**

Această parte a lucrării prezintă ipoteza de lucru și obiectivele generale, metodologia cercetării și se încheie cu rezultatele studiului.

### **Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

Prima etapă de documentare a fost efectuată asupra cazurilor de carcinom laringian ce au trecut prin secția de ORL a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova – studiul retrospectiv, documentând o perioadă de cinci ani (2010-2015), în care au fost înregistrați 387 de pacienți. În cadrul acestui studiu retrospectiv, am analizat date preexistente, mai exact pacienți diagnosticați în cadrul clinicii cu neoplasm laringian, introduși deja în baza de date, ale căror probe biologice au fost procesate și sunt deja înregistrate în Arhiva Departamentului de Anatomie Patologică.

Studiul prospectiv a cuprins 153 de pacienți selecționați dintre pacienții clinicii de ORL a SCJU Craiova diagnosticați cu neoplasm laringian, între 2015-2018. Pacienților din studiul prospectiv, odată ce au îndeplinit criteriile de includere în studiu, li s-au recoltat probe biologice (sânge) pentru izolarea ADNului și purificarea acestuia, precum și fragmente tumorale (biopsii sau piesă operatorie) împreună cu țesut sănătos pereche, pentru studiul comparativ.

Prin corelarea rezultatelor studiului retrospectiv cu rezultatele studiului prospectiv, s-a obținut o bază de date ce cuprinde 540 de pacienți.

Rezultatele celor două studii au fost centralizate într-o bază de date electronică, și s-au introdus pentru fiecare pacient: date de identificare, mediul de proveniență, comportament, mediul de lucru, comorbidități, tratamente urmate, și principalele semne și simptome pentru care pacientul s-a prezentat la medic (disfonie, dispnee, disfagie, tumefacții la nivelul regiunii cervicale), istoricul apariției simptomatologiei și evoluției de la debut până la momentul prezentării la medic, stadializarea în momentul prezentării și extensia formațiunii tumorale.

Baza electronică ce conține datele clinice, morfologice și genetice a fost realizată prin analiză statistică, folosind Microsoft Excel și SPSS.

Scopul intervenției chirurgicale, fie diagnostic, curativ sau paleativ, radical sau parțial, a fost documentat împreună cu markeri morfologici și markeri genetici, urmărindu-se corelațiile stabilite.

Beneficiind de experiența deosebită a Centrului de Excelență în Morfologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, am elaborat o cercetare histologică și imunohistochimică a probelor biotice de la pacienții incluși în studiu.

Cu ajutorul Laboratorului de Biologie Celulară și Moleculară al Universității de Medicină și Farmacie din Craiova am inițiat identificarea unor polimorfisme genetice implicate în carcinogeneza laringiană. Protocolul de lucru pentru identificarea polimorfismelor genetice a cuprins etapele: izolarea ADN genomic din sângele recoltat, urmând izolarea ADN genomic din țesuturile recoltate, realizarea evaluării spectrofotometrice, a identificării variantelor alelice prin Real-Time Polymerase Chain Reaction și interpretarea rezultatelor.

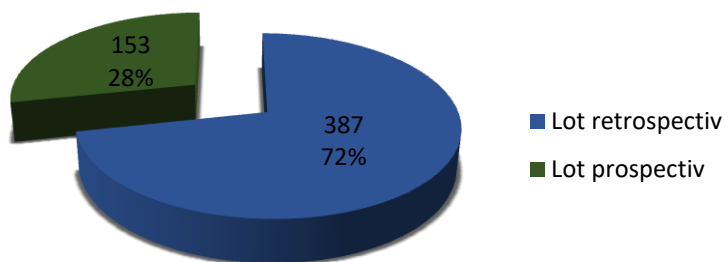


Fig. 1 Procentajele loturilor de studiu din totalul pacienților

## Metodologia cercetării

Materialul este reprezentat de piesele operatorii, fie ele biopsii laringiene sau piese de laringectomie, prelevate în cadrul Clinicii ORL și prelucrate în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică și Laboratorului de Genetică Umană ale Spitalului Clinic Județean de Urgență din Craiova și Universității de Medicină și Farmacie din Craiova.

Simptomatologia pacienților cu cancer laringian este dominată de trei simptome esențiale de intensitate variabilă în funcție de etajul laringian afectat: disfonia, disfagia și dispneea.

Anamneza aduce informații despre vârsta, genul pacientului, mediul profesional și familial, consumul de alcool și tutun, tratamente urmate, alergii, antecedente personale patologice și fiziologice.

### **Examenul clinic** al pacienților a cuprins:

- Inspecția capului și gâtului cu accent pe regiunea cervicală (laterocervical, prelaringian), urmărind orice fel de modificare de colorație și vascularizație a tegumentului, de continuitate, mergând până la modificări de formă determinate de structuri subiacente.
- Palparea regiunii faciale și cervicale, cu accent pe stațiile ganglionare
- Bucofaringoscopia
- Laringoscopia
  - Laringoscopia indirectă
  - Endoscopia laringiană (endoscop rigid de 70°)
  - Nazo-faringo-laringoscopia flexibilă (fibroscopie laringiană)
    - În lumină albă (White Light)
    - NBI (Narrow-Band Imaging)
  - Laringoscopia suspendată
  - Panendoscopie - suspiciune de tumori sincrone, carcinom cu punct de plecare neprecizat (CUP Syndrome)
- Explorare imagistică
  - Ecografia cervicală
  - Radiografie față și profil
  - Tranzit baritat (în cazuri selecționate)
  - Computer Tomograf (CT)
  - Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN)
  - Pentru excluderea metastazelor la distanță: CT craniu, ecografie abdominală, radiografie pulmonară, scintigrafie osoasă
- Examen paraclinic de laborator (VSH, HLG, etc).



Protocoalele de lucru pentru tehnica anatomopatologică sunt stabilite în urma unei analize microscopice prin metode histopatologice, completate uneori cu metode imunohistochimice. Markerii imunohistochimici folosiți în studiu sunt: p53, proteina S100, Ki67, PCNA, EGFR, CD44, EMA.

Evaluarea genetică urmărește identificarea polimorfismului rs2245214 (c.574-12777G>C), izolarea ADN genomic din sângele periferic, evaluarea spectrofotometrică (evaluare concentrație și puritate ADN) și tehnica Real Time PCR pentru identificarea polimorfismelor mononucleotidice. Prima condiție de verificat este testarea echilibrului Hardy-Weinberg (HWE). Pentru exemplificarea analizei era nevoie de compararea frecvențelor obținute în populația studiată (cancer laringian) cu un lot sănătos, lotul control. În scop demonstrativ am folosit date de genotipare ale polimorfismului studiat, deja publicate. Analiza statistică constă în calcularea odds-ratio (OR) și a intervalelor de încredere. Am ales și evaluarea folosind testul -  $\chi^2$  ( $\chi^2$  test).

## Rezultatele studiului

An	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Număr cazuri	80	85	71	61	63	49	68	28	35

Tabel 1 Repartiție cazuri pe an

În ceea ce privește repartiția pe sexe, sexul bărbătesc a fost cel mai frecvent întâlnit între pacienții incluși în studiu, reprezentat printr-un procentaj de 96,85% comparativ cu sexul feminin – 3,15%.

După repartitia pacienților pe grupe de vârstă am observat că cele mai multe cazuri de carcinoame laringiene le-am întâlnit în categoriile de vârstă înaintată, preponderent între 50 și 70 de ani, urmate aproape la egalitate de categoriile de vârstă 40-49 de ani și 70-79 de ani.

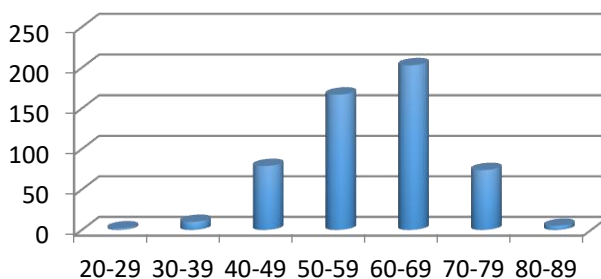


Fig. 2 Grafic distribuție cazuri pe grupe de vârstă

Am observat, în urma repartitiei pacienților după mediul de proveniență, că majoritatea provin din mediul rural – 331 cazuri înregistrate (61,3%), iar în mediul urban – 209 cazuri (38,7%).

Pe seama localizării leziunilor la nivelul laringelui, cel mai adesea am întâlnit carcinoame ce au cuprins toate cele 3 etaje ale laringelui, cel mai frecvent cu punct de plecare supraglotic, urmând după numărul de cazuri întâlnite, leziunile de la nivelul glotei – cele două localizări anatomoclinice reprezentând majoritatea covârșitoare a localizărilor leziunilor endolaringiene maligne.



Fig. 3 Grafic distribuție cazuri după etajul laringian implicat

În funcție de stadiul clinic, am observat că au predominat pacienții în stadiile III și IV, cumulând împreună peste 90% din cazurile documentate (497 cazuri), printr-o prezentare tardivă la consultul de specialitate. Cazul clinic Nr. 1 – Carcinomul laringian exteriorizat reprezintă un caz clinic ce demonstrează posibilitatea terapeutică extinsă printr-o intervenție chirurgicală radicală, cu folosirea lamboului musculo-cutanat, alcătuit din mușchiul pectoral mare.

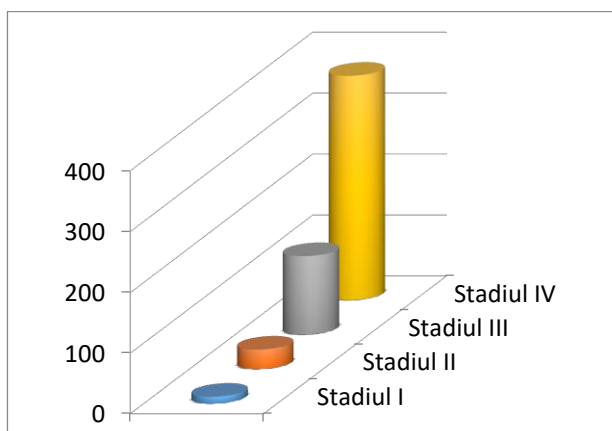


Fig. 4 Grafic distribuție cazuri după stadiul bolii la prezentare

Din lotul de 540 de pacienți, 233 (43,15%) au beneficiat de intervenții în scop curativ, dintre care 171 au fost laringectomii totale, 28 au fost corpectomii, 17 au reprezentat laringectomii orizontale supraglotice, 11 au fost laringectomii frontolaterale, iar 6 au beneficiat de laringectomii bicordocomisurale.

Pentru cea mai mare parte a lotului, însumând 307 pacienți (peste jumătate din numărul de bolnavi – 56,85%), s-au efectuat doar intervenții în scopul recoltării de probe pentru biopsie sau intervenții paliative reprezentate de traheotomii de necesitate. Aceștia au fost ulterior îndrumați către tratament oncologic de specialitate.

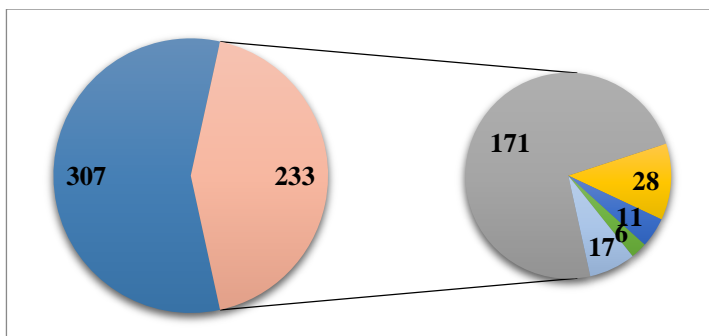


Fig. 5 Grafic distribuție cazuri după tipul de intervenție chirurgicală

**Tipurile histologice** au fost reprezentate astfel: 39 carcinoame in situ, 21 carcinoame microinvazive, 76 carcinoame bine diferențiate, 159 carcinoame moderat diferențiate, 224 carcinoame slab diferențiate, 9 carcinoame papilare, 8 carcinoame bazaloide, 2 carcinoame verucoase, 1 condrosarcom, 1 melanom malign. Majoritatea cazurilor au fost carcinoame epidermoide, dar am întâlnit și alte tipuri histologice cu localizare rară la nivelul laringelui. Am reprezentat tipurile histologice rare prin prezentările de cazuri clinice, după cum urmează:

- Cazul clinic Nr. 2 – Dublă localizare de neoplasm laringian cu două tipuri histologice diferite
- Cazul clinic Nr. 3 - Carcinom scuamos celular Bazaloid
- Cazul clinic Nr. 4 - Condrosarcom de os hioid
- Cazul clinic Nr. 5 - Metastaze laringo-traheo-bronșice de melanom malign - la acest pacient s-a practicat o analiză genetică moleculară cu detectarea mutației p.V600E, la nivelul genei BRAF. În acest fel pacientul a beneficiat de un tratament specific ce a îmbunătățit supraviețuirea.
- Cazul clinic Nr. 6 - Sarcom Kaposi laringian
- Cazul clinic Nr. 7 - Sarcom sinovial laringian

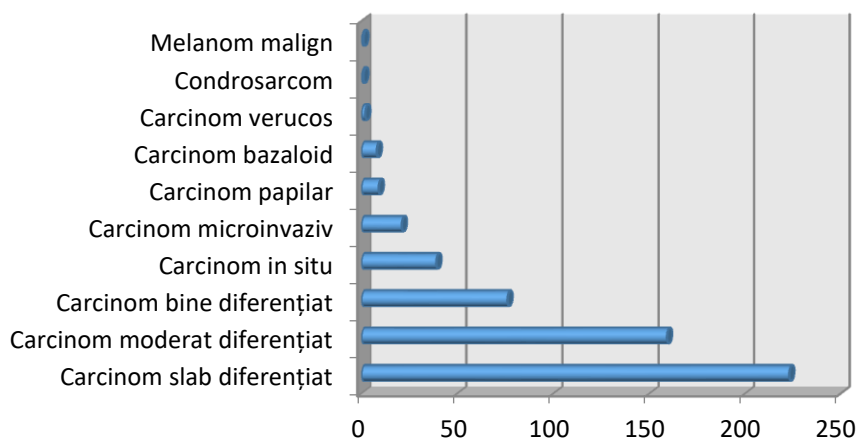


Fig 6 Grafic distribuție cazuri după tipul histopatologic al tumorii primare

În cadrul studiului histologic, la un număr de pacienți a fost necesară aprofundarea studiului histologic clasic cu un studiu imunohistochimic, folosindu-se o serie de markeri specifici. Studiul imunohistochimic l-am efectuat la 45 de cazuri selecționate, diagnosticate cu cancer laringian, în completarea studiului histologic.

Dintre cei 45 de pacienți incluși în studiul imunohistochimic, 36 au fost pozitivi pentru EGFR. PCNA a fost pozitiv la nivelul epiteliului displazic, precum și la nivelul insulelor carcinomatoase, prezența sa (20 până la 80% celule tumorale) fiind în raport direct cu gradul de agresivitate al tumorii. În cadrul studiului, expresia p53 s-a întâlnit mai rar (51% din cazuri) comparativ cu PCNA, existând, totuși, o corelație între expresiile acestor markeri tumorali - atât p53 cât și PCNA fiind mai puternic exprimate în cazul tumorilor cu malignitate ridicată.

CD44 întâlnită la 11 din cele 45 de cazuri, se asociază unui pattern slab diferențiat al cancerului, unui index mitotic crescut dar și unei frecvențe înalte a invadării ganglionare și a metastazelor. Ki-67 l-am întâlnit într-un număr considerabil de cazuri studiate imunohistochimic.

### Genotipare polimorfism ATG 5 rs2245214 (c.574-12777G>C)

În baza unui semnal fluorescent emis de către sonda TaqMan, au putut fi identificate două alele: alela G – semnal FAM și alela C – semnal VIC; de asemenea, implicit, și cele trei genotipuri: homozigot CC, heterozigot CG, precum și homozigot GG, a se vedea Fig 7.

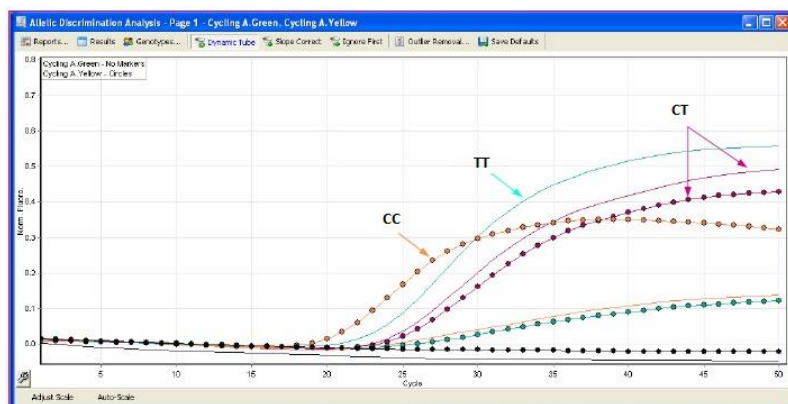


Fig. 7 Identificarea celor trei genotipuri ale ATG5 rs2245214 (c.574-12777G>C): CC, CG și GG în baza semnalului fluorescent ce a fost emis prin coloranții VIC și FAM (VIC-Yellow, FAM – Green)

## CONCLUZII

► Cancerul laringian reprezintă puțin sub 2% din totalitatea cancerelor din organism. Carcinoamele însumează 95-98% din neoplasmele maligne ale laringelui.

► Tratamentul se adresează simultan tumorii laringiene, precum și ariilor ganglionare aparținând regiunii cervicale. La momentul de față tratamentul este complex, atât chirurgical, cât și radioterapic, chimioterapic și imunoterapic.

► Opțiunile chirurgicale curente cuprind chirurgia endoscopică laser, chirurgie conservatoare, laringectomiile parțiale și laringectomiile totale. Tehnicile chirurgicale vor depinde de localizarea și de extensia tumorii primare, dar și de prezența sau absența metastazelor ganglionare.

► În cazuistica studiată, conduita terapeutică a ariilor ganglionare cervicale a constat în evidare ganglionară radicală modificată pentru pacienții cu N3, uneori extirpându-se în bloc împreună cu vena jugulară internă și cu mușchiul sternocleidomastoidian. La pacienții cu N1 și N2 s-au realizat limfadenectomii selective jugulocarotidiene, de lanț spinal, paratraheale, prelaringiene. Pentru cazurile ce au beneficiat de laringectomii totale sau laringectomii orizontale supraglotice s-a efectuat controlul tuturor ariilor ganglionare corespunzătoare.

► Rezultatele postoperatorii ale pacienților incluși în studiu sunt superpozabile celor înaintate de alți autori din literatură, cu supraviețuirea la 5 ani de aproape 80%.

► Studiul histopatologic al carcinomului laringian a evidențiat o valoare crescută a carcinoamelor epidermoide (mai bine de 95%), dar a

evidențiat și o serie de tipuri histopatologice speciale: condrosarcom, sarcom sinovial bifazic, sarcom Kaposi, melanom malign.

► După gradul de diferențiere, am constatat că cel mai frecvent întâlnit a fost carcinomul slab diferențiat G3, ce se asociază unei rate crescute a metastazelor, având prognostic nefast cu risc mare de recidivă.

► Din lotul pacienților studiați în cadrul cercetării imunohistochimice, 80% au testat pozitiv pentru EGFR, acesta fiind regăsit considerabil ridicat la nivelul pieselor tumorale, față de mucoasa normală – rezultate promițătoare ce promovează utilitatea EGFR în studiul carcinoamelor laringiene. Cazurile evaluate PCNA au prezentat un index semnificativ mai crescut în leziunile ce au degenerat ulterior către malignitate. Astfel, putem considera evaluarea PCNA drept un marker pentru potențialul de malignizare. Pe lângă PCNA, și proteina p53 a fost mai bine exprimată în tumori cu malignitate ridicată. Implicarea expresiei CD44 în mecanismul dezvoltării și al progresiei tumorilor de laringe, poate ajuta în a prezice transformarea leziunilor benigne sau a celor precanceroase în cancer. Ki-67 reprezintă un marker potrivit în detectarea proliferării maligne în cancerul laringian.

► În cadrul studiului genetic am întâlnit un caz clinic cu metastaze laringo-traheo-bronhice de melanom malign care a beneficiat de studiul mutației V600E a genei BRAF. În acest fel, administrarea unui plan terapeutic cu medicamentul Vemurafenib, inhibitor al genei BRAF a condus la o supraviețuire de peste 1 an.

► Abordarea moleculară poate evidenția markeri genetici, care împreună cu markerii histologici și imunohistochimici se pot constitui în ținte pentru protocoale complexe diagnostice, prognostice sau de screening ale carcinomului laringian.