

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**IMPORTANȚA MARKERILOR MOLECULARI TUMORALI ÎN DIAGNOSTICUL,
EVALUAREA PROGNOȘTICULUI ȘI MONITORIZAREA TRATAMENTULUI ȘI A
EVOLUȚIEI CANCERELOR CAPULUI ȘI GÂTULUI**

-REZUMAT-

Conducător științific:

PROF. UNIV. DR. FLORINEL BĂDULESCU

Doctorand:

ANDA ELENA CRIȘAN

CRAIOVA 2014

Introducere	5
Partea I: STADIUL CUNOAȘTERII	7
<i>Capitolul 1.1 Epidemiologie și factori de risc în cancerele capului și gâtului</i>	<i>7</i>
<i>Capitolul 1.2 Histopatogenia cancerelor capului și gâtului</i>	<i>13</i>
<i>Capitolul 1.3 Istorie naturală și căi de extensie în cancerele capului și gâtului</i>	<i>16</i>
<i>Capitolul 1.4 Particularități anatomice și evolutive în cancerele capului și gâtului</i>	<i>20</i>
<i>Capitolul 1.5 Diagnosticul cancerelor capului și gâtului</i>	<i>30</i>
<i>Capitolul 1.6 Prognosticul cancerelor capului și gâtului</i>	<i>41</i>
<i>Capitolul 1.7 Principii terapeutice în cancerele capului și gâtului</i>	<i>56</i>
<i>Capitolul 1.8 Urmărire, supraveghere-reabilitare, prevenție în cancerele capului și gâtului</i>	<i>79</i>
Partea II: CONTRIBUȚII PERSONALE	81
<i>Capitolul 2.1: Motivația cercetării</i>	<i>81</i>
<i>Capitolul 2.2: Material și metode</i>	<i>82</i>
<i>Capitolul 2.3 Rezultate</i>	<i>105</i>
<i>Capitolul 2.4 Discuții</i>	<i>152</i>
<i>Capitolul 2.5 Concluzii</i>	<i>174</i>
Capitolul 3 Bibliografie	177

INTRODUCERE

Cancerle sferei cap și gât reprezintă 10-15% din totalul neoplaziilor și determină 4-5% din totalul deceselor prin cancer.

Având în vedere incidența și mortalitatea în continuă creștere a neoplaziilor maligne din sfera capului și gâtului se impune necesitatea cunoașterii cauzelor creșterii acestor parametri, precum și impactului modificărilor genetice și moleculare în predicția răspunsului terapeutic și în prognosticul pacienților .

Sugestia domnului Profesor Univ. Dr. Florinel Bădulescu, a venit în întâmpinarea preocupărilor actuale privind definirea algoritmului terapeutic al cancerelor sferei cap și gât, stadii avansate locoregional, având ca reper fenotipurile clinico-histo-prognostice care au impact în predicția răspunsului terapeutic și în prognosticul pacienților.

Cuvinte cheie: cancer, sfera cap-gât, incidență, prognostic, tratament, fenotipuri clinico-histo-prognostice.

Capitolul 1, „STADIUL CUNOAȘTERII”, exprimat clar și didactic în 80 pagini relevă elemente privind epidemiologia, histopatogenia, istoria naturală, diagnosticul, criteriile de stadializare, particularitățile anatomice și evolutive, prognosticul, precum și modalitățile terapeutice aplicabile în cancerle capului și gâtului. Deasemenea, este subliniat rolul tratamentului complex și individualizat al cancerelor sferei cap și gât, respectiv chimio-radioterapia, precum și rolul terapiei țintite molecular în cadrul acestei asocieri. Radioterapia, ca principală modalitate terapeutică în cancerle capului și gâtului stadii avansate locoregional, a fost dezbătută ca terapie actuală, cât și din prisma perspectivelor terapeutice în domeniul radioterapiei, respectiv al accesibilitatea acestora și al beneficiilor statistice dovedite.

Capitolul 2, „CONTRIBUȚII PERSONALE”, se deschide cu enunțarea obiectivelor studiului :

- a) Stabilirea unor fenotipuri clinice cu valoare predictivă în cancerle capului și gâtului prin raportare la rata de răspuns la tratament;
- b) Stabilirea unor fenotipuri clinice cu valoare prognostică în cancerle capului și gâtului prin raportare la rata de supraviețuire și la intervalul liber fără semne de boală;
- c) Stabilirea corelațiilor între factorii clinici cu valoare prognostică și factorii

histoprosticistici.

În **capitolul 2.2, „Material și Metode”**, sunt descrise caracteristicile loturile de pacienți, având ca element de raportare, criteriile demografice (vârstă, sex, mediul de proveniență, status de performanță) și clinice (localizarea tumorală, stadiul bolii, tratamentul administrat) care permit individualizarea fiecărui caz în parte, conturând în acest studiu o exprimare clară și reală a oncologiei personalizate.

În cadrul studiului imunohistochimic, pentru realizarea imunomarcajului s-a utilizat tehnica LSAB-HRP cu ajutorul anticorpilor monoclonali: anti-EGFR, clone E30 DAKO (diluție 1 : 50, 16 minute la 37°C), anti-p53, clona DO-7 DAKO (diluție 1 : 50, antigen reactivat prin diluție în soluție de citrat pH 6) și anti-Ki67, clona MIB-1 DAKO (diluție 1 : 50, antigen reactivat prin imersie în soluție EDTA pH 9).

Imunoreacția pentru EGFR a fost membranară și a fost cuantificată prin metoda Altkins, iar scorul global a fost calculat prin suma scorului P (proportia celulelor imunomarcate) și I (intensitatea imunomarcajului), iar interpretarea a fost: scor 0 = absența imunomarcajului la nivelul celulelor tumorale; scor 1 - 3 = imunomarcaj slab pozitiv; scor ≥ 4 = imunomarcaj intens pozitiv.

Cuantificarea imunomarcajului nuclear pentru indicele de proliferare Ki67 s-a realizat semicantitativ utilizând următorul scor de evaluare: scor 1 - indice $\leq 15\%$; scor 2 - indice de 16 - 44%; scor 3 - indice $\geq 45\%$.

Pentru evaluarea imunomarcajului nuclear pentru proteina p53 s-a folosit următoarea scală semicantitativă: scor 0 = negativ; scor 1 = imunomarcaj nuclear în mai puțin sau egal cu 10% din celulele tumorale; scor 2 = imunomarcaj nuclear în 11 - 54% din celulele tumorale; scor 3 = imunomarcaj pozitiv în cel puțin 55% din celulele tumorale; scorurile 0 și 1 au fost considerate a fi negative pentru prezența mutațiilor la nivelul genei p53, iar scorurile 2 și 3 au fost considerate pozitive pentru aceste mutații.

Pentru analiza variabilelor luate în calcul au fost utilizate metode statistice cunoscute, respectiv, testul logrank pentru compararea diferentelor de supraviețuire existente între sub-loturi și testul t-test pentru analiza comparativă în ceea ce privește intervalul liber fără semne de boală. Analiza statistică a fost realizată computerizat (Epi INFO 2000) iar semnificația statistică a fost atinsă pentru $p < 0,05$.

Capitolul 2.3, „Rezultate”, este concentrat în rezultatele a trei studii-epidemiologic, clinic și imunohistochimic

Rezultatele studiului epidemiologic

Analiza statistică a datelor epidemiologice s-a realizat pentru localizări tumorale în care lotul de pacienți a fost semnificativ și echilibrat numeric incluzând carcinoamele orofaringelui (baza limbii și amigdală), hipofaringelui, laringelui și rinofaringelui, în orice stadiu evolutiv, excepție stadiul metastatic (stadiul IVC).

După delimitarea separată a incidenței globale (3,23‰) și a ponderei fiecărei localizări tumorale (hipofaringe:210 pacienți-40,07%, laringe:195 pacienți-37,21%, orofaringe:85 pacienți-16,22%, rinofaringe:34 pacienți-6,48%), pentru o mai bună corelare cu factorii de risc, s-a analizat distribuția cazurilor în funcție de sex, grupă de vârstă și mediu de proveniență, cu conturarea tabloului epidemiologic descriptiv caracteristic neoplaziilor sferei cap-gât, care include bărbați (463 bărbați/61 femei, index ratio 7,59/1), vârstnici (mediana vârstei 51,7 +/-13,46 ani), cu proveniență din mediu rural (rural/urban ratio:1,81, 338/186 pacienți), țarați, consumatori cronici de alcool și fumători cronici, cu igienă bucală deficitară, care se ocupă cu munci agricole, fiind expuși la soare.

Rezultatele studiului clinic

Analiza statistică a rezultatelor terapeutice s-a realizat pe un lot de 524 pacienți diagnosticați clinicoimagic și confirmați histopatologic cu neoplazii maligne în sfera cap-gât, care au fost randomizați și tratați radioterapic (270 pacienți) vs radiochimioterapic (254 pacienți) în Clinica Oncologie Craiova, în intervalul 2000-2008.

Majoritatea pacienților au prezentat boală în stadiu evolutiv avansat locoregional (stadiile III, IVA,B: 445 pacienți-84,92% vs stadiile I, II: 79 pacienți -15,07%),

Analiza statistică multivariată a *ratei de răspuns terapeutic* a decelat diferențe statistice semnificative în funcție de localizarea tumorală ($p=0.053$), stadiul bolii ($p=0.0001$) și tratamentul administrat ($p<0.0001$), demonstrând valoarea predictivă a factorilor clinici analizați în termenii ratei de răspuns terapeutic.

Intervalul liber fără semne de boală a fost luat în considerare și calculat la pacienții care nu au mai prezentat semne de boală post-terapeutic și a reprezentat

interval liber până la apariția semnelor de boală, fiind analizat după o perioadă de urmărire de 5 ani, perioadă considerată statistic semnificativă,.

Astfel din totalul celor 188 pacienți (35,87%), cu remisiune completă post-terapeutic, 95 pacienți (50,53%) au prezentat eșecuri terapeutice, după un interval median liber de boală de 7 luni.

Majoritatea pacienților (89 pacienți-93,68%) au prezentat fie continuarea evoluției locoregionale a bolii, ca urmare a erorilor terapeutice, respectiv a intervenției chirurgicale practică ca prim gest terapeutic în stadiile avansate locoregional ale bolii (73 pacienți-76,84%) sau reluarea evoluției locoregionale a bolii, în lipsa aprecierii clinicoimagistice a reconvertirii la operabilitate în stadiile avansate locoregional ale bolii, dar cu remisiuni completă post-radio-chimioterapie (16 pacienți-16,84%).

Eșecurile terapeutice înregistrate ca reluare a evoluției locoregionale a bolii, au fost înregistrate în cazul pacienților radiotratați (6 pacienți-6,32%), fiind consecința erorilor de diagnostic, cu substadializarea bolii în lipsa imagisticii utile în aprecierea extensiei reale a afecțiunii și nerespectarea în consecință a protocoalelor terapeutice.

Analiza statistică multivariată a intervalului liber de boală a decelat diferențe statistic semnificative în funcție de localizarea tumorală ($p=0.0002$) și stadiul bolii ($p=0.0091$) demonstrând valoarea predictivă a factorilor clinici analizați în termenii intervalului liber de boală.

La analiza multivariată a intervalului liber de boală în funcție de terapia administrată nu a fost atins pragul semnificației statistice ($p = 0.3179$); în ambele brațe terapeutice eșecurile au fost înregistrate după un interval liber median de boală de 7 luni, însă procentul eșecurilor terapeutice în cazul pacienților radiochimiotratați a fost de 3 ori mai redus (35,41% vs 100%).

La analiza *ratei supraviețuirii la 5 ani*, raportarea datelor s-a realizat după o perioadă de monitorizare post-terapeutică de 5 ani, mortalitatea prin cancer al sferei cap-gât fiind de 40,07% (210 decese) cu o supraviețuire mediană de 19 luni.

Erorile terapeutice practicate în stadiile avansate locoregional a carcinoamelor sferei cap-gât au fost responsabile de decesul pacienților, înregistrat în momentul

raportării datelor prin reluarea evoluției locoregionale a bolii, post-chimioterapie paliativă de linia I regim 5FU/Cisplatin (16 pacienți) sau prin evoluția bolii la distanță, post-chimioterapie paliativă de linia II regim Paclitaxel/Carboplatin (metastaze osoase-44 pacienți și/sau pulmonare-29 pacienți).

Erorile de diagnostic practicate în stadiile localizate a carcinoamelor sferei cap-gât au fost responsabile de decesul pacienților, înregistrat în momentul raportării datelor prin reluarea evoluției locoregionale a bolii, post-chimioterapie paliativă de linia I, regim 5FU/Cisplatin (6 pacienți). Deasemenea, 7 pacienți diagnosticați cu carcinom al orofaringelui (amigdală palatină) stadii localizate cu remisiune completă la terapia primară, au prezentat reluarea evoluției locoregionale a bolii după un interval de 19 luni, decesul fiind înregistrat în momentul raportării datelor prin reluarea evoluției locoregionale a bolii, post-chimioterapie paliativă de linia I, regim 5FU/Cisplatin.

Deasemenea, decesele au fost înregistrate la pacienții care au prezentat aspect de boală stabilizată post-terapie primară (38 pacienți post- radio-chimioterapie, 70 pacienți post- radio-terapie); decesul a fost înregistrat în momentul raportării datelor prin reluarea evoluției locoregionale a bolii, post-chimioterapie paliativă de linia I regim 5FU/Cisplatin.

Analiza statistică multivariată a *ratei supraviețuirii la 5 ani* a decelat diferențe statistic semnificative în funcției de localizarea neoplazică ($p < 0.0001$), stadiul bolii ($p < 0.0001$) și tratamentul administrat ($p < 0.0001$) demonstrând valoarea predictivă a factorilor clinici analizați în termenii ratei de supraviețuire la 5 ani.

Astfel, *factorii clinici cu valoare predictivă și prognostică* sunt stadiul bolii, localizarea tumorală și tratamentul administrat; astfel, pacienții diagnosticați cu carcinoame ale rinofaringelui și orofaringelui, stadii localizate, radio-chimiotratați, au prezentat rezultate statistic semnificativ superioare în termenii ratei de răspuns terapeutic ($p = 0.053$) și al supraviețuirii generale ($p < 0.0001$), cu o reducere de 3 ori a ratei recidivelor locale.

Rezultatele studiului imunohistochimic

Selectarea pacienților pentru studiul imunohistochimic a avut ca reper datele obținute în cadrul studiului clinic, în care rezultatele au atins pragul semnificației

statistice, în lotul pacienților radio-chimiotratați și au permis stratificarea pacienților în grupe prognostice după cum urmează.

a) prognostic nefavorabil (51 pacienți decedați în momentul raportării datelor dintre care 35 pacienți cu intervenție chirurgicală ca prim gest terapeutic practică eronat și 16 pacienți fără evaluare clinicoimagistică a reconvertirii la operabilitate);

b) prognostic intermediar (38 pacienți cu aspect de boală stabilizată post-radio-chimio-terapie la care a fost înregistrat decesul în momentul raportării datelor);

c) prognostic favorabil (4 pacienți cu remisiune completă post-radio-chimio-terapie și cu boală controlată locoregional și la distanță în momentul raportării datelor).

Colorațiile imunohistochimice realizate pe fragmentele provenite din biopsia leziunii tumorale, a decelat în cazul carcinoamelor epidermoide slab diferențiate, o relație liniară între gradul de diferențiere tumorală și expresia membranelor pentru EGFR, respectiv imunomarcajul nuclear pentru p53 și Ki67.

Deasemenea, analiza statistică în cadrul studiului imunohistochimic a decelat o relație liniară între intensitatea expresiei membranelor pentru EGFR, valoarea procentuală a imunomarcaj nuclear pentru p53 și ki67 și categoria clinică prognostică.

Factorii clinico-histo-prognostici cu impact în prognosticul pacienților (localizarea anatomică a neoplaziei, stadiul bolii, tratamentul administrat, tipul histopatologic, gradul de diferențiere tumorală și expresia markerilor tumorali) creează premiza unei randomizări terapeutice corecte pe baza buletinelor histopatologice și imunohistochimice (intensitatea colorației EGFR și valoarea procentuală a expresiei p53 și ki67), după cum urmează:

a) prognostic favorabil: absența imunomarcajului membranelor pentru EGFR, imunomarcaj nuclear pentru p53, ki67 absent sau prezent în < 10% din celulele tumorale;

b) prognostic intermediar: imunomarcaj membranelor slab pozitiv pentru EGFR, imunomarcaj nuclear pentru p53 în < 55% din celulele tumorale (10-55%) și imunomarcaj nuclear pentru ki67 în < 45% din celulele tumorale (10-45%);

c) prognostic nefavorabil: imunomarcaj membranelor intens pozitiv pentru EGFR, imunomarcaj nuclear pentru p53 pozitiv în > 55% din celulele tumorale și imunomarcaj nuclear pentru ki67 pozitiv în > 45% din celulele tumorale;

Capitolul 2.4 „ Discuții ”, aprofundează aspectele pregnante ale studiului care a demonstrat impactul radio-chimio-terapiei concomitente în îmbunătățirea răspunsului terapeutic și în prognosticul pacienților și a definit factorii clinico-histo-prognostici, creând premiza unei randomizări terapeutice corecte pe baza buletinelor histopatologice (tip histopatologic, grad de diferențiere tumorală) și imunohistochimice (intensitatea colorației EGFR și valoarea procentuală a expresiei p53 și ki67).

Capitolul 2. 5, „Concluzii”, în număr de 5 clar și sugestiv enunțate sunt o continuare logică și firească a rezultatelor studiului.

- 1) Funcționarea la parametrii optimali a Registrului Regional de Cancer impune un diagnostic clinicoimagistic și confirmare histopatologică. Factorii clinici cu valoare predictivă și prognostică sunt stadiul bolii, localizarea tumorală și tratamentul administrat.
- 2) Sunt definite clar elementele definitorii ale oncologiei personalizate care are ca domeniu abordarea diagnostică și terapeutică individualizată a pacienților cu cancer ale sferei cap-gât cu implicații directe asupra răspunsului terapeutic și prognosticul pacienților.
- 3) Analiza imunohistochimică a decelat pe de o parte o relație liniară între tipul histopatologic, gradul de diferențiere tumorală și expresia markerilor tumorali, iar pe de altă parte între factorii clinici cu valoare prognostică și factorii imuno-histo-prognostici curând posibilitatea definirii fenotipurilor clinico-imuno-histo-prognostice.
- 4) Deasemenea, menționăm rolul prognostic al determinării HPV , prezența acestuia fiind corelată cu răspunsul terapeutic, care va reprezenta domeniul de abordare al studiilor viitoare.
- 5) Studiul, certifică necesitatea abordării terapeutice complexe concomitente a cancerelor sferei cap-gât, care se impune ca standard terapeutic. Îmbunătățirea controlului locoregional al bolii rămâne obiectivul radioterapiei performante-conformaționale, cu regim de doză hiperfracționat. Randomizarea terapeutică corectă are la bază criteriile clinice și imunohistochimice, respectiv buletinele histopatologice și imunohistochimice; grupa cu prognostic nefavorabil, la care se impune asocierea radioterapie-terapieantiEGFR ca standard terapeutic, incluzând pacienți diagnosticați cu carcinoame epidermoide slab diferențiate ale hipofaringelui și laringelui stadii avansate.