

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
COALA DOCTORAL

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL CLINIC, HISTOPATOLOGIC,
IMUNOHISTOCHEMIC ȘI GENETIC AL CARCINOAMELOR
DE PLEOAPĂ**

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF.UNIV.DR. MOGOANT LAURENȚIU

STUDENT-DOCTORAND:

BĂLĂOIU ANDREI-THEODOR

CRAIOVA

-2015-

CUPRINS

PARTEA GENERAL

INTRODUCERE.....	4
CAPITOLUL I – Anatomia globului ocular.....	4
Tunica extern a globului ocular.....	5
Tunica medie a globului ocular.....	5
Tunica intern a globului ocular.....	5
Cristalinul.....	5
Camerele globului ocular.....	5
CAPITOLUL II – Anexele globului ocular.....	6
Conjunctiva.....	6
Mu chii extrinseci ai globului ocular.....	6
Pleoapele.....	6
Aparatul lacrimal.....	6
CAPITOLUL III – Carcinogeneza cutanat	6
Carcinomul bazocelular.....	6
Carcinomul scuamos.....	6
Melanomul malign.....	7

PARTEA PERSONAL

CAPITOLUL IV – Studiul clinico-epidemiologic al carcinoamelor de pleoap	7
--	----------

CAPITOLUL V – Studiul histopatologic al carcinoamelor de pleoap	8
CARCINOAMELE BAZOCELULARE (CB) ALE PLEOAPEI.....	8
CARCINOAMELE SCUAMOASE (CS) ALE PLEOAPEI.....	8
CAPITOLUL VI – Studiul imunohistochimic al carcinoamelor de pleoap	9
IMUNOEXPRESIA FACTORILOR DE PROLIFERARE.....	9
IMUNOEXPRESIA FACTORILOR IMPLICAȚI ÎN APOPTOZĂ.....	9
IMUNOEXPRESIA FACTORILOR DE CREȘTERE.....	9
CAPITOLUL VII – Studiul genetic al carcinoamelor de pleoap	10
Expresia genică a VEGF-A.....	10
Expresia genică a EGFR.....	10
CAPITOLUL VIII – Discuții generale.....	10
CAPITOLUL IX – Concluzii.....	11
BIBLIOGRAFIE.....	12

Cuvinte cheie: carcinom bazocelular, carcinom scuamos, TNM, imunohistochimie, expresie genică, p53, bcl-2, PCNA, ki-67, VEGF, EGFR

INTRODUCERE

Tumorile maligne ale pleoapelor reprezintă de fapt tumori maligne ale tegumentului și sunt complet vindecabile, dacă sunt diagnosticate în timp util. [1] Tumorile cutanate pot avea ca țesut de origine epidermul, dermul sau anexele pleoapei. Aceste tumori pot fi extrem de rare metastaze ale altor situri tumorale și includ tumori diferite din punct de vedere histopatologic, ce provin din diverse tipuri de celule cutanate. [2]

Leziunile maligne sunt relativ frecvent întâlnite în jurul ochiului, din cauza faptului că majoritatea sunt induse de expunerea solară sau provin din leziuni benigne cutanate, cauzate de razele solare. Multe dintre aceste leziuni sunt de dimensiuni mici și au un ritm lent de creștere, fapt ce nu alarmează pacientul, întârziind astfel contactul cu medicul. De aceea majoritatea a tumorilor pleoapelor nu dau metastaze, ele pot fi foarte distructive la nivel local, de aceea orice leziuni perioculară evolutivă, mai ales dacă se asociază cu sângerare, trebuie biopsiată. Confirmarea histopatologică a malignității este salutară înainte de rezecții majore sau de alte proceduri chirurgicale ce pot duce la rezultate estetice slabe. [2]

CAPITOLUL I

Anatomia globului ocular

Analizatorul vizual preia informația din mediul înconjurător sub formă de fascicule luminoase, pe care o analizează și o interpretează. Procesele vederii și percepției vizuale implică un sistem complex de structuri, fiecare dintre acestea fiind conceput pentru un scop precis. Organizarea fiecărei structuri îi permite acestuia să își îndeplinească funcția. Ochiul găzduiește elemente care preiau fasciculele luminoase și le transformă în influx nervos, fiind protejat prin înveliș și localizarea sa la nivelul orbitei. [13]

Cele trei tunici ale globului ocular sunt următoarele:

- tunica externă sau tunica fibroasă, alcătuită din corneea și sclera
- tunica medie sau tunica vasculară, alcătuită din coroidă, corp ciliar și iris
- tunica internă sau retina, având atât părți optice, cât și părți non-vizuale. [14]

Tunica extern a globului ocular

Tunica fibroasă a globului ocular poate fi comparată cu două sfere unite. Cea anterioară este mai mică în dimensiuni și transparentă, reprezintă o esime din tunica externă și poartă denumirea de cornee. Aceasta are o rază de curbură de aproximativ 8mm. Sfera posterioară se numește scleră, este mai mare în dimensiuni decât corneea, este opacă, dură și reprezintă cinci esime din tunica externă. Sclera reprezintă scheletul fibros al globului ocular, conferindu-i acestuia formă și rezistență, reprezentând totodată locul de inserție al mușchilor extrinseci și intrinseci ai globului ocular. Sclera are o rază de curbură de aproximativ 12mm.

Tunica medie a globului ocular

Tunica medie a globului ocular sau uvea este alcătuită din trei regiuni, acestea fiind următoarele (în sens antero-posterior): irisul, corpul ciliar și coroida. Uvea se numește și stratul vascular pentru că structura sa cea mai voluminoasă, coroida, este alcătuită în principal din vase de sânge ce irigă straturile retiniene superficiale. [13]

Tunica internă a globului ocular

Tunica internă a globului ocular este de fapt un strat nervos, denumit **retină**, situat între coroidă și vitros. Retina se întinde de la marginea discului optic (locul de ieșire al fibrelor nervoase de ochi) și până la ora serrata, unde se continuă cu epiteliul corpului ciliar, cele două având origine embriologică comună. Retina conține zeci până la sute de milioane de celule și procese celulare, și, în ciuda acestui fapt pare o membrană subțire, transparentă. [13]

Cristalinul

Cristalinul este o structură transparentă, eliptică, avasculară, situată în camera posterioară a ochiului, anterior de corpul vitros și posterior de iris. Cristalinul este suspendat de corpul ciliar înconjurător prin fibrele zonulare. Fața posterioară este atașată de vitrosul anterior prin ligamentul capsular hialoid, ce reprezintă de fapt un inel circular de adeziune. În acest inel există un spațiu virtual, spațiul retrocristalinian, o arie lipsită de adeziuni între vitros și cristalin. [13]

Camerele globului ocular

Globul ocular conține trei camere: camera anterioară, camera posterioară și vitrosul. Camera anterioară și camera posterioară conțin umor apos, în timp ce vitrosul conține gelul vitrean. [13]

CAPITOLUL II

Anexele globului ocular

Anexele globului ocular reprezintă structuri situate în apropierea globului ocular. Acestea sunt: pleoapele, conjunctiva, mușchii extrinseci ai globului ocular și aparatul lacrimal, ce include componenta secretorie (ce produce lacrimile) și componenta excretorie (ce drenează lacrimile). [13]

CAPITOLUL III

Carcinogeneza cutanată

Cancerul este în esență o boală genetică, ce se caracterizează prin instabilitate genomică și prin acumularea de defecte genetice și epigenetice. Modificările genetice care induc maladia canceroasă pot fi moștenite ca oncogene și gene supresor tumorale, ducând la sindroame canceroase familiale. În procesele de replicare și reparare a ADN-ului pot apărea defecte, fapt ce poate duce la neoplazie într-un mod similar.

Carcinomul bazocelular

Descoperirea mutațiilor la nivelul genei *patched 1 (PTCH1)* în genomul pacienților cu sindrom Gorlin (cunoscut drept sindromul carcinomului bazocelular nevoid) și în carcinomul bazocelular sporadic a dus la descoperirea importanței căii de semnalizare SHH în carcinogeneza umană [7,16]. Mutațiile genei PTCH1 sau ale unei alte componente a căii de semnalizare sunt implicate în dezvoltarea unor neoplazii precum: meduloblastom, carcinom mamar, meningiom, cancer de colon [7,17], adenocarcinom pancreatic și adenocarcinom esofagian [7,18,19] și cancer pulmonar cu celule mici [17,20].

Carcinomul scuamos

Dezvoltarea carcinomului scuamos este de fapt un process multistep, care necesită o serie de mutații, ce implică în principal căi anti – apoptotice și de proliferare celulară. Genele de o vdit importanță, care suferă mutații în carcinoamele scuamoase sunt TP53, RAS și p16/CDKN2A [3,8].

Melanomul malign

Transformarea unui melanocit normal în melanoma apare prin acumulare secvențială de alterări genetice și moleculare, care sunt momentan doar parțial înțelese. La nivel molecular, activarea căilor de semnalizare ale kinazei proliferative ce implică oncogene precum BRAF, NRAS sau KIT, urmată de neregularități ale căilor îmbătrânirii și apoptozei ce implică gene supresor tumorale precum CDKN2A, TP53 sau PTEN, reprezintă evenimente în dezvoltarea de tip multistep a melanomului malign [3,15].

CAPITOLUL IV

STUDIUL CLINICO - EPIDEMIOLOGIC AL CARCINOAMELOR DE PLEOAP

Carcinomul bazocelular reprezintă cea mai frecventă tumoră malignă umană. În Statele Unite aproximativ 75 – 90% din neoplaziile cutanate sunt carcinoame bazocelulare și peste 90% din tumorile pleoapelor sunt de asemenea carcinoame bazocelulare [3,4,5,6]. Aproximativ 99% dintre carcinoamele bazocelulare apar la populația caucaziană [2].

În Statele Unite, a doua tumoră cutanată ca frecvență este carcinomul spinocelular, reprezentând aproximativ 10 – 20% din tumorile maligne cutanate și 5% din tumorile maligne ale pleoapelor [9,10]. Ca localizare perioculară, el afectează cel mai frecvent pleoapa inferioară. În comparație cu carcinomul bazocelular, carcinomul spinocelular afectează mai frecvent pleoapa superioară și cantusul lateral [11,12].

Pentru această lucrare am luat în studiu cazurile într-o perioadă de cinci ani (2010–2014) urmărind localizarea, frecvența și tipul histologic al tumorii, precum și modalitățile de reconstrucție. Studiul cuprinde un număr de 103 pacienți cu carcinoame de pleoapă, 54 de pacienți de sex masculin și 49 de pacienți de sex feminin, având vârste cuprinse între 47 și 92 de

ani. Studiul s-a desfășurat în perioada menționată în Clinica de Oftalmologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova.

CAPITOLUL V

STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL CARCINOAMELOR DE PLEOAP

Carcinomul bazocelular al pleoapei cuprinde un grup de tumori cutanate maligne, caracterizate prin prezența unor lobuli, coloane, benzi sau cordoane de celule bazaloide ("celule germinative") [21].

Multiplele variante de carcinom bazocelular sunt au ca trăsături histologice comune prezența lobulilor, coloanelor, benzilor sau cordoanelor de celule bazaloide, citoplasmă puțină și aranjarea celulelor periferice în palisadă, înconjurată de stromă fibromucoasă liberă. Sunt adesea prezente și zone de retracție între tumoră și stromă. Interacțiunea dintre tumoră și stromă este slabă prin lipsa caracteristicilor hemidesmozomilor, ce ancorează epidermul de derm. Apoptoza este de obicei absentă. Eliberarea de keratin în stromă, ca rezultat al apoptozei, poate duce la formarea depozitelor amiloide. Degenerarea chistică mucoasă și vacuolizarea focală cu diferențiere lipidică sau canaliculară pot fi de asemenea observate. În cazuri rare, mai pot fi observate sebocite sau diferențiere foliculară cu vârtejuri scuamoase, granule de tricohialin și corneocite gri – albastre. În unele tumori pot exista și proliferații melanocitare, ce pot duce la pigmentare prin producerea de melanin, care poate fi depozitat în celulele tumorale sau în macrofagele înconjurătoare [21].

Carcinomul scuamos reprezintă o tumoră malignă a keratinocitelor epidermale, în care componenta celulară prezintă diverse grade de diferențiere scuamoasă [21]. Carcinomul scuamos este alcătuit din cuiburi, fâșii și cordoane de celule cu diferențiere scuamoasă, ce iarna tere din epiderm și se extind în derm pe distanță variabilă. Celulele prezintă citoplasmă eozinofilică abundentă și un nucleu mare, frecvent vezicular; se pot observa punți intercelulare proeminente. Există keratinizare centrală variabilă și formare de perle keratice, în funcție de gradul de diferențiere al tumorii [21].

Gradul de anaplazie din cuiburile de celule tumorale se folosește pentru grading-ul tumoral. O clasificare mai degrabă subiectivă este cea care împarte carcinoamele scuamoase în bine, moderat și slab diferențiat. Majoritatea carcinoamelor scuamoase iau naștere din keratoza actinică, iar dovada este prezenta acestei leziuni la marginea tumorii invazive. Ocazional, carcinoamele scuamoase infiltrază de-a lungul tecii nervoase, adventiceii vaselor sanguine, limfaticelor și planurilor fasciale. Prezența limfocitelor perineurale este un element ce face posibilă prezența invaziei perineurale pe secțiunile profunde [21]. La periferia tumorii poate exista și un slab până la moderat infiltrat inflamator cronic, ce poate include uneori și eozinofile [21,22].

Studiul histopatologic s-a efectuat pe 103 de cazuri de carcinoame de pleoape luate în studiu, dintre acestea 80 au fost carcinoame bazocelulare și 23 au fost carcinoame scuamoase. Studiul histopatologic a urmărit evaluarea unor parametri histopatologici care au fost corelați cu parametrii clinici și imunohistochimici.

CAPITOLUL VI

STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL CARCINOMELOR DE PLEOAPĂ

Analiza *imunohistochimică* s-a realizat pe un lot de 43 de cazuri de carcinoame cutanate primitive ale pleoapei, diagnosticate în perioada 2010-2014 în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova.

În cadrul studiului au fost efectuate reacții simple utilizând un panel de anticorpi pe care i-am clasificat astfel:

- Factori de proliferare (ki67, PCNA)
- Factori implicați în apoptoză (p53, bcl-2)
- Factori de creștere (VEGF, EGFR)

În cadrul studiului imunohistochimic am evaluat imunoexpresia ki67, PCNA, p53, bcl-2, EGFR și VEGF în cadrul unui lot de 43 de carcinoame cutanate ale pleoapei, în raport cu tipul leziunii, gradul de diferențiere, extensia tumorală (categoriile T și N) și stadiul tumoral. În cadrul studiului nu au fost identificate metastaze la distanță ale carcinoamelor analizate (M0).

În cadrul studiului au fost analizate 23 de carcinoame bazocelulare. De asemenea, în cadrul studiului au fost analizate comparativ un număr de 20 de carcinoame scuamoase.

CAPITOLUL VII

STUDIUL GENETIC AL CARCINOMELOR DE PLEOAP

Au fost incluse în studiul nostru 29 de perechi de probe, constând în fragment de tumor (T) și margine de rezecție (țesut peritumoral – PT), provenind de la pacienți care au fost spitalizați, diagnosticați și operați în Clinica de Oftalmologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, România, între anii 2013 și 2014. Toate cazurile au fost diagnosticate prin proceduri standard de diagnostic și confirmate din punct de vedere histopatologic.

Cele 29 de perechi de probe, studiate în vederea determinării expresiei genice a VEGF și EGFR, au corespuns astfel: 17 perechi de probe au provenit de la pacienții diagnosticați cu carcinom bazocelular al pleoapei și 12 perechi de la pacienți cu carcinom scuamos al pleoapei.

Expresia genică a VEGF-A a fost studiată pe 29 de perechi de probe conținând țesut tumoral și peritumoral. Analiza prin qRT-PCR a arătat faptul că VEGF-A a fost exprimat atât în tumoră, cât și în țesutul peritumoral, dar în mod variabil.

Expresia genică a EGFR a fost studiată pe 29 de perechi de probe conținând țesut tumoral și peritumoral. Analiza prin qRT-PCR a arătat faptul că EGFR a fost exprimat atât în tumoră, cât și în țesutul peritumoral, dar în mod variabil.

CAPITOLUL VIII

DISCUȚII GENERALE

Carcinoamele cutanate ale pleoapei reprezintă cele mai frecvente tumori ale regiunii perioculare. Carcinomul bazocelular palpebral este cea mai frecventă tumoră malignă umană. Carcinomul scuamos este a doua tumoră cutanată ca frecvență (după carcinomul bazocelular).

Din punct de vedere histopatologic, studiul nostru arat o predominanță netă a carcinoamelor bazocelulare, față de cele scuamoase, cu un raport de aproximativ 3,5/1.

Dintre markerii de proliferare celulară, ki67 este o proteină nucleară cu greutate moleculară mare și este considerat drept cel mai de încredere marker de proliferare. Factorul de creștere PCNA a prezentat în studiul nostru o expresie medie / înaltă, atât în carcinoamele bazocelulare, cât și în cele scuamoase.

Dintre factorii implicați în moartea celulară programată, bcl-2 este o genă importantă în mecanismul apoptozei, ea codificând o proteină care inhibă apoptoza. Expresia anormală a acestei gene poate duce la pierderea controlului asupra celulelor modificate, predispunând astfel la dezvoltarea neoplaziei [24,25]. Mutațiile proteinei p53 sunt frecvente în cazul unor tumori maligne, iar detecția imunohistochimică reflectă modificările la nivel genic, dat fiind faptul că proteina p53 normală nu se detectează ușor datorită timpului de înjumătățire scurt și a nivelelor scăzute [24,26].

În acest studiu imunoexpresia EGFR și a VEGF au fost superioare pentru carcinoamele scuamoase, comparativ cu cele bazocelulare, aspecte care au fost semnificative statistic.

În carcinoamele scuamoase ale capului și gâtului, expresia crescută a VEGF se asociază cu progresia către un fenotip tumoral mai agresiv, atât clinic, cât și experimental [23,27].

CAPITOLUL IX

CONCLUZII

Studiul nostru pune în evidență o creștere a incidenței carcinoamelor de pleoapă în ultimii ani, precum și un trend crescător de la un an la altul.

Analiza moleculară a acestor tumori poate avea consecințe terapeutice, terapiile moleculare țintite putând reprezenta o alternativă la tratamentul clasic la pacienții țarați, ce nu pot suporta o intervenție chirurgicală sau la pacienții cu boală avansată locală și/sau metastatică.

BIBLIOGRAFIE SELECTIV

1. Tamara Mouratova – Epidemiology of ocular tumors in children and adults. First Edition, 2013; 100-123
2. Gregory J. Vaughn, Richard K. Dortzbach, Gregg S. Gayre – Free Medical Textbook. Chapter 93 – Eyelid Malignancies
3. Tatyana Milman, Steven A. McCormick - The molecular genetics of eyelid tumors: recent advances and future directions Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (2013) 251:419–433
4. Iwasaki JK, Srivastava D, Moy RL, Lin HJ, Kouba DJ (2010) The molecular genetics underlying basal cell carcinoma pathogenesis and links to targeted therapeutics. J Am Acad Dermatol 66:e167–e178
5. Meyer T (2009) Molecular pathogenesis of basal cell carcinoma. Cancer Treat Res 146:193–204
6. Prabhakaran VC, Gupta A, Huilgol SC, Selva D (2007) Basal cell carcinoma of the eyelids. Compr Ophthalmol Update 8:1–14
7. de Zwaan SE, Haass NK (2010) Genetics of basal cell carcinoma Australas J Dermatol 51:81–94
8. Tsao H (2001) Genetics of nonmelanoma skin cancer. Arch Dermatol 137:1486–1492
9. Mehta M, Fay A (2009) Squamous cell carcinoma of the eyelid and conjunctiva. Int Ophthalmol Clin 49:111–121
10. Nindl I, Rösl F (2009) Molecular pathogenesis of squamous cell carcinoma. Cancer Treat Res 146:205–211
11. Kwitko ML, Boniuk M, Zimmerman LE. Eyelid tumors with reference to lesions confused with squamous cell carcinoma. I. Incidence and errors in diagnosis. Arch Ophthalmol. 1963;69:693–7.
12. Lederman M. Discussion of carcinomas of conjunctiva and eyelid. In: Boniuk M, ed. Ocular and adnexal tumors. St Louis: CV Mosby; 1964:104–9.
13. Lee Ann Remington. Clinical Anatomy of the Visual System. Second Edition, 2005; Elsevier
14. Keith L. Moore, Arthur F. Dalley. Clinically Oriented Anatomy. Fifth Edition, 2006; Lippincott Williams and Wilkins; 957-977
15. BlokxWA, van Dijk MC, Ruiter DJ (2010) Molecular cytogenetics of cutaneous melanocytic lesions—diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. Histopathology 56:121–132
16. Hahn H, Wicking C, Zaphropoulos PG et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. Cell 1996; 85: 841–51
17. Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW et al. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. Cancer Res. 1997; 57: 2369–72.
18. Watkins DN, Peacock CD. Hedgehog signalling in foregut malignancy. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 1055–60.
19. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature 2003; 425: 851–6.

20. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG et al. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422: 313–17
21. World Health Organization: Classification of Tumours Pathology and Genetics of Skin Tumours; edited by Philip E. LeBoit, Günter Burg, David Weedon, Alain Sarasin. IARC Press Lyon, 2006
22. Lowe D, Fletcher CD, Shaw MP, McKee PH (1984). Eosinophil infiltration in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histopathology* 8: 619- 625.
23. Kanitz A, Imig J, Dziunycz PJ, Primorac A, Galgano A, et al. (2012) The Expression Levels of MicroRNA-361-5p and Its Target VEGFA Are Inversely Correlated in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 7(11): e49568
24. Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol.* 2006;543-47
25. Park HR, Min SK, Cho DC, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin and htert in skin tumors. *J Cut Pathol.* 2004;31:544-9
26. Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, Pearson ADJ, Lunec J. p53 Cellular Localization and Function in Neuroblastoma: Evidence for Defective G1 Arrest Despite WAF1 Induction in MYCN-Amplified Cells. *Am J Pathol.* 2001;158:2067-77.
27. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, et al. (1999) Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*5: 775–782.