

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

*STUDIUL FACTORILOR DE PROGNOSTIC ÎN
CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE*

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA

STUDENT - DOCTORAND

DR. MÎRȘAN (CERCELARU) LILIANA

CRAIOVA

2017

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. CONSIDERAȚII EPIDEMIOLOGICE ȘI FACTORI DE RISC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE

I.A. CONSIDERAȚII EPIDEMIOLOGICE ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE

I.B. FACTORI DE RISC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE

CAPITOLUL II. DATE RECENTE PRIVIND CARCINOGENEZA LARINGIANĂ

CAPITOLUL III. FACTORI DE PROGNOSTIC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE

CAPITOLUL IV. CLASIFICAREA TUMORILOR LARINGIENE

CONTRIBUȚII PROPRII

OBIECTIVELE STUDIULUI

CAPITOLUL V. MATERIAL ȘI METODE

V.A. MATERIALUL CERCETAT

V.B. METODE UTILIZATE ÎN CERCETARE

CAPITOLUL VI. REZULTATE

VI.A. STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC AL PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LARINGIENE

VI.B. STUDIUL MORFOLOGIC AL PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LARINGIENE

VI.C. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL CARCINOAMELOR SCUAMOASE LARINGIENE

CAPITOLUL VII. DISCUȚII

VII.A ANALIZA CLINICO-EPIDEMIOLOGICĂ A PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LARINGIENE

VII.B ANALIZA MORFOLOGICĂ A PACIENȚILOR CU CARCINOAME SCUAMOASE LARINGIENE

VII.C ANALIZA IMUNOHISTOCHIMICĂ A CARCINOAMELOR SCUAMOASE LARINGIENE

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

Cancerul capului și gâtului se află pe locul opt în lume ca și frecvență iar dintre acestea carcinoamele laringiene reprezintă 30-40% [2,3]. Carcinomul laringian constituie 2,4% din totalitatea neoplasmelor diagnosticate anual [4]. Carcinomul scuamos laringian este considerat o afecțiune a sexului masculin, frecvent diagnosticat între 40-70 de ani fiind însoțit de mortalitate crescută în rândul acestora, net superioară femeilor [7,9]. În ultimii ani s-a identificat o creștere a acestei patologii și în rândul pacienților de sex feminin cel mai probabil datorită deprinderii obiceiului de a fuma sau a consuma alcool [5-6]. În ceea ce privește localizarea tumorii la diferitele etaje ale laringelui, localizarea glotică este cea mai frecventă localizare întâlnită, cel mai rar fiind diagnosticată localizarea la nivelul etajului infraglotic [9]. Sunt descriși o multitudine de factori de risc care influențează apariția cancerului precum stilul de viață (tutun, alcool), dietă, ocupația, diverși agenți externi, statusul socio-economic dar și prezența unor leziuni precursore, precum leucoplazia sau laringita cronică [6,11,13,21].

Cancerul apare în urma unor modificări repetate și între care există diverse tipuri de asocieri, fiind influențate atât de predispoziția genetică cât și de diverși factori externi [95]. S-a constatat faptul că suprimarea genelor supresoare și activarea oncogenelor permit apariția celulelor tumorale care încep să prolifereze pentru ca în final să formeze tumora primitivă [117]. Este necesară identificarea numeroaselor fenomene care intervin în apariția și progresia cancerului, pentru că aduc informații utile atât pentru procesul de cancerogeneză cât și posibilitatea identificării unor factori de prognostic. Prezentul studiu a urmărit evaluarea unor markeri clinico-epidemiologici, histopatologici și imunohistochimici pentru identificarea unor posibile ținte prognostice dar și o diagnosticare cât mai precisă cu folosirea unui tratament cât mai util încă din primele etape.

Cuvinte cheie: carcinom scuamos laringian, carcinogeneza laringiană, factori prognostici, markeri imunohistochimici.

CAPITOLUL I. CONSIDERAȚII EPIDEMIOLOGICE ȘI FACTORI DE RISC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE- Acest capitol este dedicat datelor recente preluate din literatura de specialitate privind epidemiologia și factorii de risc implicați în carcinoamele scuamoase laringiene.

CAPITOLUL II. DATE RECENTE PRIVIND CARCINOGENEZA LARINGIANĂ- este un capitol care descrie etapele unui proces complex, care presupune perturbarea a numeroase fenomene genetice și moleculare.

CAPITOLUL III. FACTORI DE PROGNOSTIC ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LARINGIENE- prezintă date privind factorii de prognostic asociați cu apariția carcinoamelor scuamoase laringiene: vârstă, sex, localizarea tumorii, prezența metastazelor ganglionare, gradul de diferențiere sau mutații ale genelor p16, p53.

CAPITOLUL IV. CLASIFICAREA TUMORILOR LARINGIENE- Ultima clasificare propusă de Organizația Mondială de Sănătate a fost realizată în anul 2017 și aduce informații noi în ceea ce privește cancerul laringian. Aceste date recente prezintă modificări ale etiopatogenezei, în special legate de virusul HPV.

CAPITOLUL V. MATERIAL ȘI METODE- Presentul studiu a fost realizat pe o perioadă de 3 ani și cuprinde un număr de 293 cazuri de carcinoame scuamoase laringiene. Materialul utilizat pentru cercetare a fost reprezentat de material uman provenit de la pacienți internați în Clinica de ORL a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, precum și blocurile de parafină din histoteca Laboratorului de Anatomie Patologică. Materialul obținut a fost prelucrat conform tehnicii uzuale de includere la parafină și colorat cu Hematoxină-Eozină. Tehnica imunohistochimică a cuprins un total de 38 cazuri și am utilizat ca metodă de lucru tehnica LSAB2-HRP (Labelled Streptavidin-Biotin 2 System; DAKO, Redox, cod K0675). Anticorpii utilizați sunt: EGFR, Ki67, p53, bcl-2, E-caderina, P-caderina, β -catenina, ciclin D1, Snail.

CAPITOLELE VI și VII. REZULTATE ȘI DISCUȚII- aceste capitole cuprind datele obținute în urma efectuării prezentului studiu iar ulterior acestea au fost comparate cu datele din literatura recentă, de specialitate.

Am remarcat faptul că incidența carcinoamelor scuamoase laringiene a prezentat o creștere progresivă din decada V până în decada VII de viață iar în ceea ce privește incidența pe sexe a leziunilor, am constatat o predominanță netă a afecțiunilor la sexul masculin. Literatura de specialitate confirmă aceleași aspecte [136, 155].

În 91,8% din cazuri a fost identificată prezența obiceiului de a fuma. Fumatul reprezintă principalul factor de risc incriminat în apariția carcinoamelor iar diverse studii raportează valori mari pentru acest obicei, cuprinse între 86,8 și 95% [6,156].

În cazurile noastre, am constatat faptul că toate cazurile de cancer laringian au corespuns carcinomului scuamos iar ca și varietăți acestea au fost reprezentate de formele necheratinizate în 82,3% din cazuri, 16,4% din cazuri au corespuns aspectului cheratinizat, forma bazaloidă în 0,7% din cazuri și câte un caz de carcinom verucos și respectiv carcinomul papilar, reprezentând 0,3%. Aspectul necheratinizat corespunde formelor slab diferențiate care se asociază de obicei cu un prognostic prost al evoluției pacienților [4]. Din punct de vedere al gradului histologic, cele mai numeroase au fost carcinoamele moderat diferențiate diagnosticate în 50,5% din cazuri, urmate de formele slab diferențiate cu 31,8% și de cele bine diferențiate în 17,7% din cazuri.

Invazia vasculară a fost identificată în 82 de cazuri iar cea perineurală în 169 din cazuri. Analiza implicării ganglionilor limfatici a indicat prezența adenopatiei metastatice în 25,4% din cazuri și absența acesteia în 74,6% din cazuri. Evaluarea stadializării pTNM a cuprins 3 cazuri care au corespuns stadiului I, 10 cazuri care au corespuns stadiului II, 37 de cazuri care au corespuns stadiului III și 17 cazuri care au corespuns stadiului IV de boală.

Pentru studiul imunohistochimic am folosit următoarele categorii de markeri: factori de creștere și proliferare (EGFR, KI67), markeri ai apoptozei (p53, bcl-2), molecule de adeziune (E-caderina, P-caderina, β -catenina), factori ai ciclului celular (ciclin D1) și factori de transcripție (Snail).

Analiza imunoexpresiei EGFR în carcinoamele scuamoase laringiene ale studiului prezent, a indicat pozitivitate membranară și citoplasmatică în 34 de cazuri din cele 38 investigate imunohistochimic. În cazurile incluse în studiu am constatat o incidență de

54,7%, cu o expresie înaltă în formele moderat și slab diferențiate de carcinoame scuamoase laringiene comparativ cu formele bine diferențiate. Cu ajutorul testului chi-pătrat am obținut valori semnificative ($p=0,015$) între expresia markerului EGFR și gradul de diferențiere, expresia fiind înaltă în formele slab diferențiate.

Analiza imunomarcajului Ki-67 a indicat o pozitivitate nucleară în 42,6% din cele 38 de cazuri analizate. De asemenea, în studiul nostru, am obținut asociere semnificativ statistică ($p=0,000$) între markerul Ki-67 și gradul de diferențiere, folosind testul Anova.

Analiza imunohistochimică a markerului p53 a relevat o pozitivitate de 52,5% în studiul nostru din cele 38 de cazuri investigate imunohistochimic. Atât procentul cât și intensitatea reacțiilor pozitive a variat cu gradul de diferențiere și stadiul pTNM. Cele mai mari valori de 75,7% au fost obținute în formele slab diferențiate. În studiul nostru, am obținut o asociere semnificativă între p53 și stadiul pTNM ($p=0,031$, testul chi-pătrat).

Pozitivitatea markerului bcl-2 a fost observată în 33 de cazuri din cele 38 investigate imunohistochimic în studiul nostru. În stadiile avansate, III și IV, precum și formele slab diferențiate de carcinoame am obținut cele mai mari valori iar valoarea procentuală medie a fost de 42,7%. Analiza statistică a studiului nostru a demonstrat asocieri semnificative între marker și gradul de diferențiere ($p=0,018$, test Anova) dar și stadiul pTNM ($0,015$, test Anova).

În studiul nostru, E-caderina a fost identificată atât la nivel membranal cât și citoplasmatic într-un număr superior, de 53,6% în cazurile bine diferențiate, 19,8% în cele moderat diferențiate și 17,4% în cazurile slab diferențiate. Analiza statistică a punctat o asociere semnificativă obținută între gradul de diferențiere tumoral și expresia E-caderinei ($p=0,000$, test chi-pătrat).

Imunoreacția P-caderinei am identificat-o în 46,09% din cazurile investigate imunohistochimice. Stadiile avansate și formele slab diferențiate, au prezentat cele mai mari valori. Mai mult, am obținut și asociere semnificativă între marker și gradul de diferențiere ($p=0,000$, test chi-pătrat).

În prezentul studiu β -catenina a fost identificată în toate localizările, membranal, citoplasmatic și nuclear, în 37,2% din cazuri. În formele moderat și slab diferențiate

precum și în stadiile avansate de boală, am constatat prezența mai ales a localizării citoplasmice și nucleare a markerului comparativ cu formele bine diferențiate. Analiza statistică în cazul acestui marker a demonstrat asociere semnificativă între marker și gradul de diferențiere ($p=0,043$, test chi-pătrat).

În urma investigării expresiei markerului ciclin D1 am obținut o pozitivitate de 29,3% în cele 36 de cazuri investigate. Expresia ciclin D1 a crescut cu gradul de diferențiere, cele mai mari valori fiind obținute în formele slab diferențiate. În studiul nostru, am obținut o asociere semnificativă între ciclin D1 și gradul de diferențiere ($p=0,010$, test chi-patrat).

Imunoexpesia Snail a fost evidentă la nivel nuclear în 61,5% din cele 38 de cazuri analizate. Reacția a fost intensă și foarte bine exprimată în cazurile slab diferențiate și în stadiile avansate. Am obținut asocieri semnificative între expresia Snail și categoria N ($p=0,020$, test chi-pătrat), stadiul pTNM ($p=0.010$, test chi-pătrat) și gradul de diferențiere ($p=0,004$, test chi-pătrat).

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII

Dintre cele mai importante concluzii amintim:

Cele mai multe cazuri analizate, și anume 118 cazuri (40,2%) au corespuns intervalului cuprins între 60-69 ani.

Am constatat o predominanță netă a afecțiunilor la sexul masculin, în 98,3% din cazuri.

Studiul factorilor de risc ne-a indicat o majoritate a cazurilor în care fumatul și consumul de alcool au fost principalii factori de risc, în 269 și respectiv 102 de cazuri.

Încadrarea tumorilor, din punct de vedere al varietăților histopatologice, a corespuns următoarelor forme: forme necheratinizate în 241 de cazuri, un număr de 48 de cazuri au corespuns formei cheratinizate, forma bazaloidă în 2 cazuri și carcinom verucos în același număr cu carcinomul papilar, fiecare cu câte un caz (0,3%).

Un alt criteriu histopatologic al studiului nostru a fost gradul de diferențiere, care ne-a permis identificarea a unei majorități de 148 de cazuri moderat diferențiate, urmate

de 93 de cazuri de carcinoame scuamoase slab diferențiate și 52 de cazuri carcinoame scuamoase laringiene bine diferențiate.

Statusul limfoganglionilor a reprezentat un parametru important și am observat că cele mai multe cazuri de carcinoame scuamoase laringiene, respectiv 50 de cazuri, nu au asociat prezența adenopatiei metastatice. Prezența invaziei limfoganglionare a fost observată în 17 cazuri: categoriei N1 i-au corespuns 7 cazuri și categoriei N2 10 cazuri.

În ceea ce privește stadiul pTNM, am constatat că cele mai multe cazuri au corespuns stadiilor III și IV, cu 37 de cazuri care au aparținut stadiului III și 17 cazuri stadiului IV. Au urmat stadiul II cu 10 cazuri și stadiul I cu 3 cazuri.

Analiza statistică a studiului histopatologic a identificat diferențe semnificativ statistic ($p < 0,05$, testul chi-pătrat) între gradul de diferențiere și localizare dar și varietățile histopatologice. De asemenea, asocieri au fost obținute și între categoria pTNM și categoria T, categoria N și invazia vasculară și perineurală.

O expresie înaltă a EGFR a fost obținută în formele moderat și slab diferențiate de carcinoame scuamoase laringiene comparativ cu formele bine diferențiate. Cu ajutorul testului chi-pătrat am obținut valori semnificative ($p = 0,015$) între expresia markerului EGFR și gradul de diferențiere, expresia fiind înaltă în formele slab diferențiate.

Valori mari ale indexului Ki-67 au corespuns formelor moderat și slab diferențiate iar o expresie înaltă a markerului este asociată cu cazurile slab diferențiate de carcinoame, cu prezența de metastaze ganglionare și apariția rapidă de recurențe.

Expresia imunohistochimică a markerilor apoptozei, p53 și bcl-2, a fost asemănătoare, valorile cele mai mari au fost asociate formelor slab diferențiate și în stadiul IV. Studiile au constatat asocierea coexpresiei p53 și bcl-2 cu un prognostic prost și o perioadă de supraviețuire mai mică.

În cazul E-caderinei valorile cele mai mari au fost identificate pentru carcinoamele scuamoase laringiene bine diferențiate aflate în stadiile incipiente ale bolii, stadiul I și II.

Cazurile cu evoluția cel mai probabil nefavorabilă, stadii avansate și forme slab diferențiate, au prezentat cele mai mari valori în ceea ce privește reacția P-caderinei. Mai mult, am obținut și asociere semnificativă între marker și gradul de diferențiere.

Imunoexpresia β -cateninei în formele moderat și slab diferențiate precum și în stadiile avansate de boală, a corespuns mai ales localizării citoplasmatică și nucleare a markerului comparativ cu formele bine diferențiate. Localizarea nucleară este frecvent întâlnită în cazurile de cancer de cap și gât cu un prognostic rezervat.

Am constatat, în prezentul studiu, că expresia ciclin D1 a crescut cu gradul de diferențiere, cele mai mari valori fiind obținute în formele slab diferențiate.

Reacția Snail a fost intensă și foarte bine exprimată în cazurile slab diferențiate și în stadiile avansate. Am obținut asocieri semnificative între expresia Snail și categoria N, stadiul pTNM și gradul de diferențiere.

BIBLIOGRAFIE

2. Wong YF, Yusof MM, Wan Ishak WZ, Alip A, Phua VC. Treatment outcome for head and neck squamous cell carcinoma in a developing country: university malaya medical centre, malaysia from 2003-2010. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(7):2903-8.
3. Karasmanis I, Goudakos JK, Vital I, Zarampoukas T, Vital V, Markou K. Hybrid carcinoma of the larynx: a case report (adenoid cystic and adenocarcinoma) and review of the literature. *Case Rep Otolaryngol* 2013; 2013:385405.
4. Zhang SY, Lu ZM, Luo XN, Chen LS, Ge PJ, Song XH, Chen SH, Wu YL. Retrospective analysis of prognostic factors in 205 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment. *PLoS One.* 2013, (4):e60157.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Hypopharynx, larynx and trachea. In: Kleihues P, Sobin LH (Eds):*World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, 2005, IARC Press, Lyon, 107-62.

6. Markou K, Christoforidou A, Karasmanis I, Tsiropoulos G, Triaridis S, Constantinidis I, Vital V, Nikolaou A. Laryngeal cancer: epidemiological data from Northern Greece and review of the literature. *Hippokratia*. 2013; 17(4):313-8.
7. Sharma DK, Sohal BS, Bal MS, Aggarwal S. Clinico-pathological study of 50 cases of tumours of larynx. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 65(1):29-35.
9. Wünsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2004; 122(5):188-94.
11. Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Dal Maso L, Franceschi S. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer*. 2002; 100(3):355-60.
13. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Ronco A, Kogevinas M, Mendilaharsu M. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Uruguay. *Am J Ind Med*. 1998;33(6):537-42.
21. Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J, Cardesa A. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology*. 2009; 54(6):639-56.
95. Wang Z, Sturgis EM, Zhang F, Lei D, Liu Z, Xu L, Song X, Wei Q, Li G. Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Mol Cancer*. 2012; 11:17.
117. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2005; 86(6):347–363.
136. Jaimanti, Panda NK, Sharma S, Gupta AK, Mann SB. Survival patterns in treated cases of carcinoma larynx in north india - a 10 years followup study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 56(2):99-104.
155. DeRienzo DP, Greenberg SD, Fraire AE. Carcinoma of the larynx. Changing incidence in women. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 117(6):681-4.

156. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996; 32B(5):293-305.