

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**FACTORI PROGNOSTICI ÎN LEZIUNILE
PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELE SCUAMOASE
CUTANATE. STUDIU CLINICO-EPIDEMIOLOGIC,
HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHIMIC**

REZUMAT

**STUDENT - DOCTORAND:
MARINESCU ALEXANDRU**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA**

CRAIOVA 2017

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI A CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

CAPITOLUL II. FACTORI DE RISC AI LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

CAPITOLUL III. PATOGENIA LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

CAPITOLUL IV. PROGNOSTICUL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI AL CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

CERCETĂRI PERSONALE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE SPECIFICE

CAPITOLUL V. MATERIAL ȘI METODE

CAPITOLUL VI. REZULTATE

V.I.A. STUDIUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

VII.B. STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

V.I.C. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

CAPITOLUL VII. DISCUȚII

VII.A. DISCUȚII ASUPRA PARAMETRILOR CLINICO-EPIDEMIOLOGICI AI LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

VII.B. DISCUȚII ASUPRA STUDIULUI HISTOPATOLOGIC AL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE

VII.C. DISCUȚII ASUPRA STUDIULI MARKERILOR IMUNOHISTOCHIMICI ÎN LEZIUNILE PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELE SCUAMOASE CUTANATE

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

INTRODUCERE

Prevalența actuală a cancerului cutanat este alarmantă [223], în Statele Unite peste o treime din cazurile de cancer sunt de cancere cutanate nonmelanom [379]. Când sunt detectate și tratate precoce carcinoamele scuamoase au o rată de vindecare de 95% [52]. Cu toate acestea, în cazul în care sunt neglijate pot provoca distrucții tisulare locale și pot metastaza [10]. Mai mult decât atât, la un interval de timp de 3 ani de la diagnosticul inițial, riscul cumulat de a dezvolta o a doua leziune este de aproximativ 18% [419].

Multe dintre decesele datorate bolii pot fi prevenite prin tratarea celei mai precoce manifestări a carcinomului scuamos, respectiv a keratozei actinice. O keratoza actinică poate regresa, poate persista, sau poate progresa spre carcinomul scuamos, fiind imposibil de apreciat evoluția individuală a fiecărei leziuni. Conform Academiei Americane de Dermatologie, [113] se estimează că 60% dintre persoanele cu vârsta de peste 40 de ani au cel puțin o keratoză actinică. Deși se estimează că doar 0,1-10% din keratozele actinice pot progresa spre carcinomul scuamos, prezența lor servește ca indicator pentru a identifica gradul de risc al populației de a dezvoltarea afecțiunii datorate expunerii la radiațiile solare, cum este și carcinomul scuamos [84].

Gestionarea keratozei actinice este dificilă, deoarece este dificil de diferențiat clinic keratoza actinică de carcinomul scuamos. Prin urmare, examenul histopatologic este esențial pentru clinicieni atunci când se afla în imposibilitatea de a identifica în mod clar natura leziunii.

Prezentul studiu își propune o evaluare complexă a leziunilor precursore și carcinoamelor scuamoase cutanate, clinico-epidemiologică, histopatologică și imunohistochimică, cu scopul selectării unor markeri specifici în identificarea leziunilor cu risc de progresie și metastazare.

Cuvinte cheie: leziuni precursore carcinoamelor scuamoase cutanate, carcinom scuamos cutanat, keratoză actinică, boala Bowen, imunohistochimie, factori prognostici.

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI A CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE- Acest capitol selectează din literatura de specialitate date privind incidența la nivel mondial a leziunilor precursoare și a carcinoamelor scuamoase cutanate.

CAPITOLUL II.- FACTORI DE RISC AI LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE prezintă date privind factorii de risc implicați în carcinogeneza cutanată: fototipul pielii, expunerea la radiațiile ultraviolete, imunodeficiența, factorii genetici, etc.

CAPITOLUL III.- PATOGENIA LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE- prezintă mecanismele prin care expunerea la radiațiile UV determină o serie de evenimente genetice complexe care în final conduc la dezvoltarea keratozei actinice și a carcinomului scuamos.

CAPITOLUL IV.- PROGNOSTICUL LEZIUNILOR PRECURSOARE ȘI CARCINOAMELOR SCUAMOASE CUTANATE. Este analizată evoluția keratozei actinice în sensul regresiei spontane, persistenței sau progresiei spre carcinomul scuamos [28,388,163,299]. Prognosticul este influențat de momentul diagnosticării, statusul imun, mărimea leziunii, profunzimea invaziei, nivelul Clark IV), invazia perineurală, gradul tumorii (slab diferențiată/ nediferențiată), precum și localizarea anatomică [54].

CERCETĂRI PERSONALE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE SPECIFICE Prezentul studiu își propune o evaluare a carcinogenezei cutanate și identificarea factorilor implicați în evoluția nefavorabilă a unora dintre leziuni în vederea selectării celor mai fiabili markeri care caracterizează carcinogeneza cutanată, cu scopul aplicării unei terapii precoce și diferențiate prin identificarea posibilelor ținte moleculare.

CAPITOLUL V. MATERIAL ȘI METODE. Materialul studiat a fost reprezentat de foile de observație clinică, registrele anatomo-patologice, piesele de exereză chirurgicală, blocurile de parafină și lamele histologice de la cazurile studiate. Analiza leziunilor cutanate a fost făcută din punct de vedere statistic, clinico-epidemiologic, histopatologic prin tehnici uzuale, cu colorarea standard cu Hemalaum-Eozină și imunohistochimic, anticorpii utilizați au fost: P53, Bcl-2, Ki67, p16, p21, Cyclin D1, CD44, E-caderină și N-caderină.

CAPITOLELE VI. ȘI VII -REZULTATE ȘI DISCUȚII- în aceste capitole datele obținute au fost analizate și comparate cu cele din literatura de specialitate.

Studiul clinic-epidemiologic a relevat pentru ambele categorii lezionale existența unor incidente pe grupe de vârstă și sex asemănătoare, pacienții afectați mai frecvent fiind din intervalul 70-79 de ani, leziunile afectând mai frecvent sexul masculin. Topografia leziunilor - a relevat o frecvență maximă a leziunilor la nivelul capului, mai frecvent în zona obrazilor, - pentru ambele categorii lezionale studiate. Cazurile de keratoză actinică au îmbrăcat aspecte morfologice variate, cel mai frecvent întâlnit fiind tipul clasic – întâlnit în 43,7%, cel mai rar întâlnit fiind tipul bowenoid, similar cu literatura de specialitate (3,8).

Carcinoamele scuamoase investigate au îmbrăcat de asemenea o mare varietate de aspecte clinice: papule, plăci, noduli netezi sau hiperkeratozici, etc. Metastazele au fost identificate în 12 cazuri. Tumorile au fost în general asimptomatice. Leziunile au fost în toate cazurile unice, cu dimensiuni variind între 1 mm și 52 mm .

Studiul histopatologic. Keratoza actinică a constituit cea mai mare parte (84,4%) din leziunile precursorare carcinoamelor scuamoase și 22,6% din cazuistica analizată. Paternurile de creștere lezională ale keratozei actinice au fost diverse, cel mai frecvent a fost cel convențional în 41 de cazuri (30,6%), cele mai rare fiind paternul pigmentat în 5 cazuri (3,7%). Din punct de vedere al gradului histologic, cele mai numeroase au fost leziunile de tip KIN I diagnosticate în 82 de cazuri, urmate de leziunile de tip KIN II cu 38 de cazuri și de cele KIN III cu 14 cazuri.

Studiul histopatologic al celor 435 de carcinoame scuamoase a relevat forma tipică nekeratinizată în 2/3 din toate carcinoamele scuamoase analizate, carcinoamele fiind în mai mult de jumătate din cazuri moderat diferențiate, în aproximativ un sfert din cazuri bine diferențiate, iar în restul slab diferențiate. Invazia vasculo-limfatică a fost identificată în 3,2%, cea perineurală în 22,5% din cazuistică, limitele de rezecție chirurgicală au prezentat invazie tumorală în numai 43 de cazuri. Analiza implicării ganglionilor limfatici regionali (categoria pN) a indicat prezența adenopatiei metastatice în 2,8% din cazuri și absența acesteia în 88,5% din cazuri. Evaluarea stadializării pTNM a cuprins 38 de cazuri care au corespuns stadiului 0, 205 cazuri care au corespuns stadiului I, 177 de cazuri care au corespuns stadiului II și 15 cazuri care au corespuns stadiului III de boală.

În funcție de indicele Breslow, cele mai multe au corespuns stadiilor III și II (35% și respectiv 33,4%), și cele mai puține stadiului Breslow I, 4,4%.

În funcție de indexul Clark - cele mai multe dintre carcinoame au fost invazive la nivelul dermului reticular, respectiv în 207 cazuri (47,6%).

Studiul imunohistochimic. Pentru cele 91 de cazuri selectate am urmărit expresia unor markeri implicați în: apoptoză (p53 și Bcl-2), proliferare (Ki67), ciclul celular (p16, p21 și cyclin D1), adeziune intercelulară (CD44, E-caderina și N-caderina).

Analiza expresiei **p53** a evidențiat pozitivitatea reacției în 74 de cazuri (83,5%), dintre care 19 cazuri de keratoză actinică și 53 de cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza statistică a indicat diferențe semnificativ superioare ale expresiei p53 în carcinoamele scuamoase comparativ cu leziunile KIN ($p=0.000$, test chi pătrat), precum și în formele moderat sau slab diferențiate ale carcinoamelor scuamoase comparativ cu cele bine diferențiate ($p=0.000$, test chi pătrat). Nu am constatat diferențe ale expresiei p53 în raport cu stadiul tumoral ($p=0.059$, test chi pătrat).

Expresia **Bcl-2** a fost prezentă numai în cele 22 de cazuri de keratoză actinică. Nu am constatat asocieri statistice ale expresiei bcl-2 și p53 ($p=0.322$, Pearson test).

Analiza expresiei **Ki67** a evidențiat pozitivitatea reacției în 76 de cazuri (83,5%), respectiv în 20 de cazuri de keratoză actinică, în cele 2 cazuri de boală Bowen și în 54 de cazuri de carcinoame scuamoase. Testul Pearson a indicat o corelație liniară pozitivă a distribuției valorilor procentuale ale marcajelor Ki67 și p53, care a fost semnificativă statistic ($p=0.000$, Pearson test). Nu am constatat relații statistice între indexul de proliferare Ki67 și indexul antiapoptotic bcl-2 ($p=0.929$, Pearson test).

Analiza expresiei **p16** a evidențiat pozitivitatea reacției în 61 de cazuri (67%), dintre care 16 cazuri de keratoză actinică, 2 cazuri de boală Bowen și 43 de cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza statistică a indicat diferențe semnificativ superioare ale expresiei p16 în carcinoame comparativ cu leziunile KIN ($p=0.000$, test chi pătrat), precum și în carcinoamele aflate în stadiul II/III comparativ cu cele aflate în stadiul I ($p=0.029$, test chi pătrat). Nu am constatat diferențe ale expresiei p16 în raport cu gradul de diferențiere tumorală ($p=0.091$, test chi pătrat).

Analiza expresiei **p21** a evidențiat pozitivitatea reacției în 65 de cazuri (71,4%), din care 23 cazuri de keratoză actinică, 2 cazuri de boală Bowen și 40 de cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza statistică a indicat diferențe semnificative ale expresiei p21 în raport cu tipul și gradul de diferențiere al carcinoamelor ($p=0.000$, test chi pătrat). Astfel, scorurile înalte ale p21 au fost identificate doar în cazul bolii Bowen și a unor carcinoame bine diferențiate. De asemenea, cu toate că scorurile p21 înalte au fost observate doar în

carcinoamele aflate în stadii inițiale, nu am constatat relații statistice ale p21 în raport cu stadiul tumoral ($p=0.536$, test chi pătrat).

Analiza expresiei **ciclinei D1** a evidențiat pozitivitatea reacției în 65 de cazuri (71,4%), din care 19 cazuri de keratoză actinică și 46 de cazuri de carcinoame scuamoase cu grade variate de diferențiere. Analiza statistică a indicat că scorurile înalte ale ciclinei D1, au fost identificate doar în cazul carcinoamelor, acestea fiind absente în cazul leziunilor KIN ($p=0.014$, test chi pătrat). Nu am constatat diferențe ale expresiei Ciclinei D1 în raport cu stadiul tumoral ($p=0.682$, test chi pătrat).

Analiza expresiei **CD44** a evidențiat pozitivitatea imunoreacției în 84 de cazuri (92,3%), dintre care 28 de cazuri de keratoză actinică și 56 de cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza statistică a indicat diferențe semnificativ superioare în leziunile KIN comparativ cu carcinoamele, precum și în carcinoamele bine diferențiate, comparativ cu cele moderat și slab diferențiate ($p=0.005$, test chi pătrat). Nu am constatat asocieri statistice ale expresiei CD44 cu stadiul tumoral ($p=0.601$, test chi pătrat).

Analiza expresiei **E-caderina** a evidențiat pozitivitatea reacției în 72 de cazuri (79,1%), din care 28 de cazuri de keratoză actinică, 2 cazuri de boală Bowen și 42 de cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza statistică a indicat diferențe semnificativ superioare în leziunile KIN comparativ cu carcinoamele, precum și în carcinoamele bine diferențiate, comparativ cu cele moderat diferențiate ($p=0.000$, test chi pătrat). Nu am constatat asocieri statistice ale expresiei E-caderinei cu stadiul tumoral.

Analiza expresiei **N-caderina** a evidențiat pozitivitatea reacției în 26 de cazuri (28,5%), din care 13 cazuri de keratoză actinică și 13 cazuri de carcinoame scuamoase. Analiza valorilor procentuale ale marcajelor N-caderinei a indicat diferențe semnificativ superioare pentru carcinoame comparativ cu leziunile KIN ($p=0.000$, Student test).

CAPITOLUL VIII. CONCLUZII

Dintre cele mai importante concluzii amintim: clinico-epidemiologic- ambele categorii lezionale au afectat similar diversele grupe de vârstă, cu incidență maximă între 60-79 de ani, sexul masculin a fost cel mai afectat, tegumentele capului fiind cel mai frecvent implicate.

- Examenul clinic al leziunilor preinvazive a evidențiat predominanța tipului clasic al acestora (43,7%), cele mai rare forme fiind cea pigmentată și bowenoidă; carcinoamele scuamoase cutanate au avut mai frecvent aspect ulcerat (36,6%). Dimensiunile leziunilor de keratoză actinică au fost între câțiva mm și 1,8 cm; iar cele ale carcinoamele scuamoase au fost sub 2 cm în 56,3% din cazuri, și peste 2 cm în 43,7%.

- Analiza *histopatologică* a evidențiat la cazurile de keratoză actinică cel mai adesea aspecte convenționale (30,6 %), în ceea ce privește gradul histologic cele mai numeroase au fost leziunile de tip KIN I (61,1 %), iar cele mai rare KIN III (10,5%).

Pentru cele 435 de carcinoame scuamoase cutanate am observant următoarele aspecte:

- carcinoamele scuamoase convenționale necheratinizate au reprezentat cea mai frecventă varietate histopatologică (66,7%), iar carcinoamele desmoplazice au fost cele mai rare - 5 cazuri (1,1%), formele moderat diferențiate au fost cele mai frecvente (58,6%), invazia vasculo-limfatică a fost prezentă doar în 14 cazuri (3,2%), iar invazia perineurală a fost identificată în 98 cazuri (22,5%); Adenopatia metastatică am întâlnit-o în doar 2,8% din cazuri. Evaluarea stadializării pTNM s-a realizat pentru 397 de cazuri de carcinoame invazive și 38 de cazuri de carcinoame in situ, din care 38 de cazuri au corespuns stadiului 0, 205 cazuri care au corespuns stadiului I, 177 de cazuri au corespuns stadiului II și 15 cazuri care au corespuns stadiului III de boală.

- în raport cu indicele Breslow cele mai multe tumori (35%) au corespuns stadiului Breslow III, urmate în ordinea frecvenței de tumorile stadiului Breslow II (33,4%), iar cele mai rare au fost cele din stadiul Breslow II și I (10%, respectiv 4,4%).

- indexul Clark- cele mai multe carcinoame au fost invazive la nivelul dermului reticular (47,6%), urmate în ordinea frecvenței de carcinoamele cu invazia dermului papilar (23,5%), cele mai rare au fost carcinoamele cu invazie incipientă în dermul papilar (11,7%).

- studiul a indicat asocierea semnificativă a indexului Breslow V cu stadiile tumorale II și III, precum și asocierea stadiului tumoral I cu indexul Breslow I-IV ($p=0.000$, chi pătrat)

Analiza *imunohistochimică* a leziunilor precursoare și carcinoamelor scuamoase cutanate a evidențiat:

- Supraexpresia p53 a fost semnificativ superioară în carcinome comparativ cu leziunile KIN, precum și în formele moderat sau slab diferențiate ale carcinoamelor scuamoase comparativ cu cele bine diferențiate
- Reacțiile Bcl-2 pozitive au fost identificate doar într-un număr restrâns de leziuni KIN, fiind negative în cazul carcinoamelor, ceea ce pledează pentru un rol secundar al mecanismelor antiapoptotice în progresia acestor leziuni;
- Indexul mediu de proliferare Ki67 a fost semnificativ superior în cazul carcinoamelor comparativ cu leziunile KIN, precum și în cazul formelor moderat și slab diferențiate ale carcinoamelor, aflate în stadii avansate ($p=0.000$, Anova test)
- Prevalența înaltă a imunoreactivității oncoproteinei p53 (86,8%) și antigenului Ki67 (88,4%) în carcinoamele scuamoase cutanate sprijină rolul lor patogen în carcinogeneza cutanată;
- Imunoreacțiile p16 au fost semnificativ superioare în carcinoame comparativ cu leziunile KIN ($p=0.000$, chi square test), precum și în carcinoamele aflate în stadii avansate, comparativ cu cele aflate în stadii inițiale ($p=0.029$, chi square test).
- Expresia p16 a fost independentă de cea a p53,
- Scorurile înalte ale imunoreacțiilor p21 au fost identificate doar în cazul bolii Bowen și a unor carcinoame bine diferențiate;
- Imunoexpresia Ciclinei D1 a fost semnificativ superioară în cazul carcinoamelor comparativ cu leziunile KIN;
- Imunoexpresia N-caderinei a fost semnificativ superioară în cazul carcinoamelor comparativ cu leziunile KIN
- Alterarea expresiei caderinelor este asociată cu pierderea diferențierii celulare, achiziționarea unui fenotip invaziv și cu un prognostic nefavorabil; pierderea expresiei E-caderină și câștigarea expresiei N-caderinei, sunt evenimente ce amintesc de comutarea caderinelor procesul de tranziție epitelio-mezenchimală.

BIBLIOGRAFIE

223. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, et al., Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(3 Pt 2):467-84
379. Plasmeyer EI, Neale RE, de Koning MN, et al., Persistence of betapapillomavirus infections as a risk factor for actinic keratoses, precursor to cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69(23):8926-31
52. Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.*, 1992;27:241–248
10. Andrichow JL, Veness MJ, Morgan GJ, et al., Implications for clinical staging of metastatic cutaneous squamous carcinoma of the head and neck based on a multicenter study of treatment outcomes. *Cancer*, 2006;106:1078–83
419. Sabat M, Ribera M, Casanova JM, et al., Carcinoma epidermoide sobre lupus vulgar, *Actas Dermosifiliogr*, 2003;194:616-9
113. Drake LA, Ceilley RI, Cornelison RL, et al, Guidelines of care for actinic keratosis. *J Am Acad D* 84. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol.* Jan 2000;42(1 Pt 2):11-17
28. Berman B, Cockerell CJ, Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *J Am Acad Dermatol.*, 2013;68(Suppl 1):S10-19
388. Quaedvlieg PJ, Tirsi E, Thissen MR, et al., Actinic keratosis: how to differentiate the good from the bad ones? *Eur J Dermatol.*, 2006;16:335-339
163. Glogau RG, The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol.*, 2000;42(1 Pt 2):23-4
299. Marks R, Rennie G, Selwood T, The relationship of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratoses. *Arch Dermatol* 1988; 124(7):1039-42
54. Buethe D, Warner C, Miedler J, et al., Focus issue on squamous cell carcinoma: practical concerns regarding the 7th edition AJCC staging guidelines, *J Skin Cancer*, 2011:156391
3. Alam M, Ratner D, Cutaneous squamous cell carcinoma, *N Engl J Med.*, 2001;344:975-83
8. American Joint Committee on Cancer. Seventh Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. 2010