

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE „CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

***ASPECTE ALE PROFILULUI IMUNOLOGIC
ÎN LEZIUNI TIP KERATOZĂ ACTINICĂ
ȘI CARCINOM SPINOCELULAR***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV.

DR. IOANA ANCA BĂDĂRĂU

Doctorand:

DR. ANDREEA CĂLINESCU

(CĂS. MOROIANU)

București

2020

CUPRINS

INTRODUCERE	1
I. PARTE GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1. TEGUMENTUL – NOȚIUNI RELEVANTE DE ANATOMIA ȘI HISTOLOGIA PIELII	5
1.1. CELULELE EPIDERMULUI	5
1.1.1. KERATINOCITUL	5
1.1.2. CELULELE LANGERHANS.....	8
1.1. MEMBRANA BAZALĂ.....	9
1.2. DERMUL.....	10
1.3. VASCULARIZAȚIA PIELII.....	12
1.4. MICROBIOMUL CUTANAT	12
1.5. ÎMBĂTRÂNIREA CUTANATĂ.....	15
2. RADIȚIILE ULTRAVIOLETE ȘI CARCINOGENEZA	17
3. LEZIUNI CUTANATE PREMALIGNE ȘI MALIGNE NON-MELANOCITARE	20
3.1. EPIDEMIOLOGIE	20
3.2. FACTORI DE RISC	21
3.3. ASPECTE CLINICE	23
3.3.1. KERATOZA ACTINICĂ.....	23
3.3.2. CARCINOMUL SPINOCELULAR.....	24
3.4. METODE DE DIAGNOSTIC	27
3.4.1. DERMATOSCOPIA	27
3.4.2. BIOPSIA TEGUMENTARĂ ȘI EXAMENUL HISTOPATOLOGIC	28
3.5. ASPECTE HISTOPATOLOGICE.....	30
3.5.1. KERATOZA ACTINICĂ.....	30
3.5.2. CARCINOMUL SPINOCELULAR.....	33
3.6. STADIALIZAREA CARCINOMULUI SPINOCELULAR.....	35
3.7. FACTORI DE RISC PENTRU RECURENȚA LOCALĂ ȘI METASTAZAREA LA DISTANȚĂ ÎN CARCINOAMELE SPINOCELULARE CUTANATE	37
3.8. TRATAMENT	41
3.8.1. KERATOZA ACTINICĂ.....	41
3.8.2. CARCINOMUL SPINOCELULAR.....	45
3.9. BIOMARKERI PENTRU STRATIFICAREA RISCULUI ÎN CARCINOAMELE SPINOCELULARE CUTANATE	49
3.9.1. BIOMARKERI AI TRANZIȚIEI EPITELIAL MEZENCHIMALE	49

3.9.2.	CD1A	51
3.9.3.	MOLECULA DE ADEZIUNE CELULARĂ A ANTIGENULUI CARCINOEMBRIONIC 1	52
3.9.4.	BIOMARKERI DIN INFILTRATUL INFLAMATOR PERITUMORAL	53
II.	CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	58
4.	IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII	58
5.	METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII.....	60
5.1.	MATERIALE ȘI METODE.....	60
5.2.	METODE HISTOPATOLOGICE ȘI IMUNOHISTOCHIMICE UTILIZATE	63
5.2.1.	PROTOCOL DE ORIENTARE MACROSCOPICĂ A PIESELOR DE EXCIZIE ALE TUMORILOR CUTANATE MALIGNE.....	64
5.2.2.	PROTOCOL DE LUCRU PRELUCRARE HISTOPATOLOGICĂ AUTOMATĂ 65	
5.2.3.	PROTOCOL DE LUCRU COLORAȚIE HEMATOXILINĂ-EOZINĂ.....	66
5.2.4.	PROTOCOL DE LUCRU IMUNOHISTOCHIMIE	66
5.2.5.	CRITERII DE EVALUARE ALE REACȚIEI IMUNOHISTOCHIMICE	68
6.	ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL KERATOZĂ ACTINICĂ.....	69
6.1.	REZULTATE	69
6.2.	DISCUȚII.....	84
7.	ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL CARCINOM SPINOCELULAR.....	89
7.1.	REZULTATE	89
7.2.	DISCUȚII.....	114
8.	CARACTERIZAREA IMUNOHISTOCHIMICĂ A LOTURILOR.....	120
8.1.	REZULTATE	120
8.1.1.	CD1A	120
8.1.2.	BIOMARKERI AI TRANZIȚIEI EPITELIAL-MEZENCHIMALE	124
8.1.3.	BIOMARKERI DIN INFILTRATUL INFLAMATOR PERILEZIONAL	131
8.1.4.	CEACAM1	138
7.2.	DISCUȚII.....	138
9.	CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	143
9.1.	CONCLUZII.....	143
9.1.1.	LOT KERATOZĂ ACTINICĂ.....	143
9.1.2.	LOT CARCINOM SPINOCELULAR	144
9.1.3.	PARAMETRI IMUNOHISTOCHIMICI	145
9.2.	CONTRIBUȚII PERSONALE	148

BIBLIOGRAFIE.....	150
LISTĂ DE ABREVIERI	176
LISTĂ DE TABELE.....	180
LISTĂ DE FIGURI	181
ANEXE.....	189

I. PARTE GENERALĂ - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Carcinomul spinocelular (CSC) este a doua tumoră cutanată ca frecvență după epiteliomul bazocelular (EBC),¹ ambele având ca punct de origine keratinocitul epidermic. Incidența CSC este în continuă ascensiune în ultimele decenii, date din studiul epidemiologic Rochester condus de clinica Mayo din Minnesota, estimând o creștere totală cumulată cu 263% în perioadele 1976-1984 și 2000-2010.² Considerat tradițional ca reprezentând aproximativ 20% din cancerurile cutanate,³ CSC este citat în studii recente din Statele Unite ale Americii (SUA) ca atingând un raport de 1:1 comparativ cu EBC în populația plătitoare de servicii medicale.⁴ Cel mai probabil, creșterile înregistrate se datorează în principal creșterii speranței de viață și a populației vârstnice,⁵ precum și atenției sporite acordate *screening-ului* pentru cancer de piele în ultimele decenii. CSC poate să apară în orice zonă a corpului, inclusiv la nivelul mucoaselor, dar cel mai frecvent apare în ariile cu expunere cronică la radiații ultraviolete (RUV) precum fața, gâtul, urecheile, scalpul, membrele.⁶ Cu un diagnostic și tratament precoce CSC este vindecabil în cele mai multe cazuri, studiile indicând o rată de vindecare de peste 90% și o rată totală de recurență, cumulând recurența locală și metastazele limfatice, de 6.7%.⁷ Leziunile pot fi însă desfigurante și chiar mortale dacă este permisă creșterea excesivă, CSC fiind responsabil de majoritatea deceselor cauzate de cancerurile cutanate non-melanocitare și de 20% din totalul deceselor cauzate de cancerurile de piele în general.^{8,9}

Pacienții cu risc de a dezvolta CSC sunt predispuși să dezvolte și keratoze actinice (KA), leziuni premaligne care demonstrează o parte dintre caracteristicile histologice ale CSC. Prevalența acestora precum și numărul crescut al leziunilor per individ sunt însă mult mai ridicate decât în cazul CSC. Rata de evoluție către carcinom spinocelular invaziv a KA este variabilă, studiile sugerând un risc anual de transformare ce variază între 0.025-20% per leziune,^{10,11} astfel încât există controverse privind potențialul lor invaziv. Cu toate acestea, KA reprezintă o problemă medicală importantă din mai multe considerente. În primul rând, diferențierea de CSC invaziv strict pe criterii clinice și dermatoscopice poate reprezenta o provocare, dar reprezintă o necesitate, având în vedere conduita terapeutică diferită. În al doilea rând, prezența lor poate fi motiv de disconfort și anxietate, în special în rândul pacienților cu antecedente personale de CSC. În al treilea rând, inflamația și

scuamele cu care aceste leziuni sunt asociate contribuie la morbiditatea asociată fotoîmbătrânirii. Luând în considerare incidența în continuă creștere a CSC cutanat precum și potențialul său prognostic nefavorabil, această tumoră cutanată și precursorul său, KA, reprezintă probleme ale sănătății publice în ascensiune.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII

Prezentul studiu își propune o evaluare completă și amănunțită a proliferărilor cu punct de pornire keratinocitar tip keratoză actinică (KA) și carcinom spinocelular (CSC). Luând în considerare incidența în continuă creștere a CSC cutanat precum și potențialul său prognostic nefavorabil în cazul depistării în faze avansate, această tumoră cutanată și precursorul său, KA, reprezintă probleme ale sănătății publice în ascensiune. Numeroase studii existente tentează analiza posibilelor mecanisme implicate în oncogeneza KA și CSC sau dezbate criteriile de diferențiere între aceste leziuni, fie ele clinice, histologice, imunohistochimice sau prin intermediul anomaliilor cromozomiale. Deși au fost concepute variate sisteme pentru stadializarea leziunilor, cu scopul de a îmbunătăți valoarea prognostică, niciunul nu poate prezice cu exactitate riscul metastatic pentru CSC cutanat primar.^{12,13} Lipsa noastră de înțelegere deplină a mecanismelor fiziopatologice din spatele tumorigenezei cancerelor cutanate keratinocitare, precum și deficitul studiilor bazate pe modele animale ce replică cu fidelitate caracteristicile histopatologice ale acestora la om fac ca managementul optim al pacienților să fie în continuare dificil. Identificarea mecanismelor complexe care se desfășoară la nivel molecular și a interacțiunilor dintre acestea poate oferi informații importante și utile în ceea ce privește inițierea și progresia tumorală, precum și prognosticul pacienților cu acest tip de leziuni. În acest scop am evaluat exhaustiv KA și CSC cutanate cu ajutorul metodelor histopatologice clasice, dar și prin tehnici moderne cum este imunohistochimia, în paralel cu cele mai relevante date clinice. Astfel, am evaluat date demografice, clinice, markeri de prognostic histopatologici deja consacrați și markeri imunohistochimici implicați în diferite etape ale carcinogenezei, urmărind identificarea de posibile noi ținte prognostice și terapeutice.

Pentru realizarea scopului propus am urmărit îndeplinirea mai multor obiective, după cum urmează:

- descrierea celor mai importante aspecte cu privire la datele demografice și clinice ale loturilor studiate în vederea identificării unor factori de risc clinici sau comportamentali implicați în patogeneza KA și CSC;
- extinderea cunoștințelor asupra trăsăturilor histopatologice și imunohistochimice ale KA și CSC în vederea identificării mecanismelor și a markerilor ce guvernează invazia și agresivitatea precum și a celor mai specifici markeri ai evoluției și prognosticului acestor leziuni;
- compararea expresiei unor markeri imunohistochimici implicați în diverse aspecte ale tumorigenezei în leziunile tip KA și CSC și expresia acestora în tegumentul indemn, pentru a evidenția mecanismele și markerii ce contribuie la transformarea malignă a keratinocitelor;
- realizarea unei comparații și corelații între expresia markerilor de prognostic histopatologici clasici și expresia markerilor imunohistochimici studiați, în vederea identificării unor noi asocieri ce ar putea reflecta evoluția leziunilor de KA și CSC;
- identificarea și definirea parametrilor morfologici ce caracterizează KA și CSC în vederea aplicării unei terapii precoce și diferențiate prin identificarea posibilelor ținte moleculare.

5. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

5.1. MATERIALE ȘI METODE

Pentru realizarea studiului asupra factorilor de prognostic clinici, morfopatologici și imunohistochimici în KA și CSC cutanate am realizat un studiu tip caz-control, retrospectiv. Lotul final de studiu este alcătuit din 94 probe, repartizate astfel: 32 leziuni tip KA, 32 leziuni tip CSC și 30 fragmente de tegument indemn perilezional provenind de la pacienți fără antecedente de tumori cutanate maligne. Toate cazurile provin din arhiva Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina, fiind diagnosticate în perioada 2013-2015. Studiul a primit aprobarea Comisiei de Etică a Cercetării Științifice a Spitalului Clinic Colentina, București. (ANEXA 3)

Criteriile de includere pentru selecția cazurilor au fost:

- prezența confirmată histopatologic a leziunilor de keratoză actinică;
- prezența confirmată histopatologic a leziunilor de carcinom spinocelular strict la nivel cutanat;
- probă prelevată tip rezecție integrală în toate cazurile.

Criterii de excludere utilizate în selecția cazurilor:

- leziunile de la nivelul mucoaselor și semimucoasei buzelor;
- cazurile cu probă prelevată tip punch-biopsie;
- leziunile provenite de la același pacient;
- tumorile de coliziune keratoză actinică – epiteliom bazocelular sau carcinom spinocelular - epiteliom bazocelular;
- carcinom spinocelular apărute pe zone de iradiere/cicatrici cronice, fiind cunoscut faptul că acestea au un comportament biologic distinct, mult mai agresiv.

Fragmentele de tegument indemn folosite drept control au îndeplinit următoarele criterii:

- proveniență de la persoane cu același profil de vârstă și sex ca cel al pacienților din grupurile keratoză actinică și carcinom spinocelular;
- prelevare din marginile de siguranță ale unor leziuni cutanate benigne, localizate în aproximativ aceleași regiuni anatomice cu ale leziunilor din grupurile keratoză actinică și carcinom spinocelular.

Examenul anatomo-patologic al leziunilor a fost efectuat în laboratorul Serviciului de Anatomie-patologică al Spitalului Clinic Colentina, București. Pentru diagnosticul histopatologic clasic a fost utilizată colorația standard hematoxilină-eozină. Piesele chirurgicale au fost orientate macroscopic conform protocoalelor în vigoare ale specialității Anatomie Patologică, emise de Ministerul Sănătății al României și publicate în Monitorul Oficial nr.723 din 29 octombrie 2010.¹⁴ Colorația HE a fost efectuată manual sau cu ajutorul coloratoarelor automate Leica ST 5020 și Microm HMS 760; lamelele au fost montate fie manual, fie cu ajutorul montatorului automat Leica CV 5030. Rețetele pentru colorația HE respectă prevederile ghidurilor de practică medicală pentru specialitatea Anatomie Patologică emise de Ministerul Sănătății al României și publicate în Monitorul Oficial nr.723 din 29 octombrie 2010.¹⁴ În vederea efectuării de colorații imunohistochemice am realizat blocuri multitisulare. Lamele corespunzătoare fiecărui caz au fost scoase din histotecă și analizate la microscopul optic. Pe fiecare lamă analizată, am încercuit fragmente cu dimensiuni de maximum 1 cm diametru, prezentând caracteristici histopatologice specifice fiecărui tip de leziune în parte. Țesuturile fixate în formol și încorporate în parafină corespunzătoare fragmentelor încercuite au fost preluate apoi din arhiva Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina și decupate pentru a putea fi realizate blocurile multitisulare. Astfel, din fiecare bloc de parafină am selecționat fragmente de până la 1 cm în diametrul maxim care au fost apoi incluse în blocuri multitisulare. Deși selecția inițială a cuprins un număr de 42 leziuni tip KA, 45 leziuni tip CSC și 34 fragmente de tegument indemn perilezional, am exclus ulterior din studiu fragmentele de țesut subțiri, fiind selecționate doar acele cazuri la care recoltarea de fragmente de maximum 1 cm diametru nu va împiedica rediagnosticarea ulterioară. Țesutul rămas în urma decupării, neinclus în blocuri multitisulare este păstrat în histotecă conform normelor în vigoare. După constituire, blocurile multitisulare au fost resecționate și s-au efectuat 30 de secțiuni cu grosime de 3 micrometri care au fost întinse fiecare pe câte o lamă pretrată pentru teste imunohistochemice. Am utilizat markeri imunohistochemici pentru:

- ✓ Analiza tranziției epitelial mezenchimale: E-caderina, N-caderina;
- ✓ Analiza expresiei celulelor Langerhans intralezional: CD1a;
- ✓ Analiza celulelor din micromediul inflamator perilezional: CD5, CD20, CD11c;
- ✓ Analiza moleculei de adeziune și invazivitate CEACAM1.

Preparatele histopatologice și imunohistochemice au fost apoi examinate și microfotografiate în Laboratorul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina și

în Laboratorul de Medicină Experimentală și Cercetare Fundamentală din Departamentul II de Fiziopatologie al Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București, cu ajutorul unui microscop Nikon Eclipse E200 și al sistemului Leica LMD6500.

Din buletinele histopatologice am selectat și analizat următoarele date:

Lot KA:

1. **Parametri generali:** sexul, vârsta, localizarea leziunii, suspiciunea de diagnostic clinic;
2. **Parametri legați de aspectul macroscopic al leziunii:** diametrul lezional, prezența/absența ulcerărilor macroscopice;
3. **Parametri histologici ai leziunii:** subtipul histologic, gradul KIN, evaluarea mitozelor atipice, evaluarea pleomorfismului cito-nuclear; prezența/absența de agenți microbieni în suprafață;
4. **Parametri ce caracterizează infiltratul inflamator:** subtipul și severitatea infiltratului inflamator perilezional;
5. **Parametri ce țin de tegumentul perilezional:** severitatea elastozei solare asociate.

Lot CSC:

1. **Parametri generali:** sexul, vârsta, localizarea leziunii, suspiciune de diagnostic clinic;
2. **Parametri legați de aspectul macroscopic al leziunii:** diametrul tumoral, prezența/absența ulcerărilor macroscopice;
3. **Parametri histologici ai leziunii:** subtipul histologic, gradul de diferențiere, grosimea tumorală, stadiul T, nivelul de invazie în profunzime al tumorii, evaluarea mitozelor atipice, pleomorfismului cito-nuclear, prezența invaziei perivascularare și/sau perineurale, prezența necrozei tumorale asociate, prezența/absența de agenți microbieni în suprafață;
4. **Parametri ce caracterizează infiltratul inflamator:** tipul și severitatea infiltratului inflamator peritumoral;
5. **Parametri ce țin de tegumentul perilezional:** severitatea elastozei solare asociate, prezența/absența unei leziuni de KA asociate, gradul KIN al KA asociate.

În ceea ce privește markerii imunohistochimici, am analizat expresia acestora atât intralot în KA și CSC, realizând corelații și asocieri cu factori de prognostic histopatologici clasici, cât și prin analiză comparativă în cele trei tipuri de probe prelevate.

Analiza statistică a fost efectuată folosind programul IBM SPSS (Statistical Program for Social Studies) Statistics 21. SPSS utilizează o serie de mărimi medii (media, mediana și modulul) precum și câțiva indicatori ai dispersiei (deviația standard și varianța). Am folosit următoarele teste statistice: testul Chi-Pătrat, indicatorul de corelație Spearman, testul Mann – Whitney U, testul Kruskal – Wallis H și testul Wilcoxon. Reprezentările grafice au fost realizate cu ajutorul programelor Microsoft Excel 2016 și IBM SPSS Statistics 21. Rezultatele au fost exprimate ca frecvențe pentru variabilele categoriale și ca medii (\pm deviația standard) pentru variabilele numerice. Pragul de semnificație statistică ales a fost pentru o valoare a $p < 0,05$.

6. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL KERATOZĂ ACTINICĂ - REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datele epidemiologice indică o rată ridicată de apariție a KA în populațiile cu fototipuri cutanate I-III, precum și o creștere a incidenței KA în ultimele decenii.¹⁵⁻¹⁷ Majoritatea KA apare la pacienți de peste 50 de ani, iar studiile de specialitate indică o creștere a prevalenței acestor leziuni odată cu înaintarea în vârstă, depășind 80% în decada a 7-a de viață.¹⁸ Analiza distribuției pe grupe de vârstă în lotul de față se corelează cu rezultatele obținute în studiile precedente. Astfel, decada cea mai interesată de prezența leziunilor a fost 70-79 ani (48,3%), urmată de grupa 80-89 ani (28,1%) și 60-69 ani (21,9%) în timp ce sub 60 ani un singur pacient a fost identificat (3,1%). Se remarcă astfel trendul ascendent al incidenței KA odată cu înaintarea în vârstă, acestea fiind mult mai frecvente la persoanele peste 70 ani (75%). Expunerea cumulativă la radiații ultraviolete (RUV) este un factor de risc major pentru KA, determinând modificări în ADN-ul celular,^{17,19} iar un parametru important de luat în calcul pentru estimarea acesteia este vârsta, fapt ce explică frecvența ridicată de apariție a manifestărilor clinice la grupe de vârstă mai avansate. Un alt factor de risc pentru dezvoltarea KA menționat în literatură este sexul masculin, în special în decadele de vârstă timpurii, când expunerea recreațională sau ocupațională la RUV poate varia mai mult în funcție de gen.^{15,20,21} După vârsta de 50 ani, se păstrează tendința de apariție a leziunilor la bărbați, dar diferența de prevalență între sexe se atenuază.¹⁸ O explicație a acestui fenomen vine din identificarea unor factori de risc importanți, cum este alopecia, care e mai frecvent întâlnită la sexul masculin și care favorizează expunerea permanentă a scalpului la RUV în plan orizontal.²² La aceasta se adaugă, probabil, utilizarea mai redusă a cremelor de protecție solară de către bărbați. În lotul analizat, 56,3% dintre pacienți sunt de sex feminin, iar singurul pacient cu KA sub vârsta de 60 ani este de sex masculin. Acest lucru ar putea fi explicat prin prisma adresabilității crescute la medic a femeilor, influențată probabil și de impactul estetic al localizării leziunilor preponderent la nivelul feței în cazul lor (84,34% dintre femeile din lotul studiat). Astfel, în ciuda faptului că gradul de expunerea neprotejată la RUV este mai redus în cazul femeilor, acestea sunt mai frecvent diagnosticate datorită adresabilității crescute. Totuși, diferența dintre datele obținute în acest studiu și literatura de specialitate ar putea fi determinată și de numărul redus de pacienți și de perioada relativ scurtă de timp pe care a fost desfășurat.

Datele din literatura de specialitate relatează dimensiuni sub 1 cm pentru majoritatea leziunilor de KA,^{23,24} rezultate ce se confirmă și în prezentul studiu, unde 68.75% dintre leziuni se încadrează în această categorie. În ceea ce privește corelația dimensiune - gen, în lotul analizat am remarcat o frecvență mai ridicată a leziunilor cu dimensiuni mari, de peste 1 cm, în rândul bărbaților comparativ cu femeile (50% bărbați vs 16.67% femei; $p=0.044$). Acest lucru se datorează probabil diferenței existente între sexe în ceea ce privește prezentarea la medic, raportată de unele studii,²⁵ accentuată de aspectul inestetic al KA, ce motivează suplimentar femeile spre cererea unei consultații în stadii mai precoce ale leziunii.

Leziunile de KA din lotul studiat se localizează preponderent la nivelul regiunii anatomice cap și gât (81.3%), urmată de membre și torace. Distribuția este conform așteptărilor, cunoscută fiind localizarea preferențială la nivelul feței, scalpului și feței dorsale a mâinilor,^{18,24} explicată prin expunerea frecventă a acestor zone la RUV, pe tot parcursul anului. Deși în cadrul regiunii cap și gât ne-am fi așteptat ca cele mai multe leziuni să fie situate la nivelul nasului, având în vedere că nasul este cea mai expusă zonă a corpului, indiferent de comportamentul vestimentar, în lotul de față cea mai afectată zonă a fost obrazul (42.3%).

Un aspect important relevat de prezentul studiu este faptul că în mai puțin de jumătate dintre cazurile incluse (46.88%), KA a fost suspectată clinic, fiind luată în calcul ca diagnostic diferențial la internare. (*Figura 6.1*) În restul de 53.125 % dintre cazuri diagnosticul inițial a fost neconcordant cu rezultatul histopatologic, 5 dintre aceste cazuri având diagnosticul imprecis formulat („formațiune tumorală”). Deși în literatura de specialitate, principalul diagnostic diferențial al KA este CSC,²⁶ pentru care KA este leziune precursoră, se observă faptul că, în lotul de față, principala problemă de diagnostic diferențial a reprezentat-o EBC. În timp ce CSC este menționat la 8 pacienți, dintre care în 3 cazuri ca unic diagnostic și în 5 cazuri ca diagnostic diferențial (cu KA sau EBC), EBC este menționat în 9 cazuri, dintre care în 5 cazuri ca unic diagnostic. Așadar, conform rezultatelor obținute, CSC și EBC sunt patologii esențiale în diagnosticul diferențial al KA, iar numărul mare de diagnostice incerte/neconcordante cu rezultatul histopatologic susține necesitatea unui set de criterii clinice extins, care să crească gradul de suspiciune clinică în aceste leziuni și să ghideze cu mai mare precizie cazurile ce necesită efectuarea exciziei cu examinare histopatologică, reducând astfel morbiditatea asociată și impactul funcțional și estetic în cazul KA care ar putea beneficia de tratament conservator.

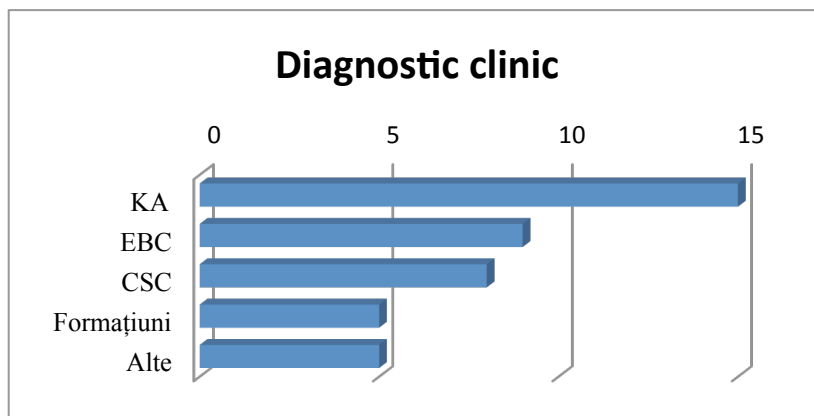


Figura 6. 1. Repartiția pacienților cu keratoze actinice confirmate histopatologic pe categorii de diagnostic clinic

În continuare, am trecut în revistă principalele modificări histopatologice întâlnite la pacienții din lotul studiat, în scopul de a atrage atenția asupra impactului puternic pe care îl are la nivelul epidermului expunerea la RUV, impact ce nu se limitează la modificări ale celulelor keratinocitare. Scorul KIN este cel mai important sistem de cuantificare al gradului de displazie în KA, fiind utilizat pentru a descrie progresia KA spre CSC invaziv, în funcție de gradul de atipie citologică keratinocitară, nivelul de extensie al keratinocitelor atipice în grosimea epidermului și aspectul clinic macroscopic al leziunilor.²⁷ În lotul studiat cea mai mare frecvență au avut-o leziunile cu displazie moderată, KIN II (43.8%), în timp ce leziunile cu displazie ușoară (KIN I) și severă (KIN III) au fost distribuite în mod egal la câte (28.1%) pacienți fiecare. Așa cum era de așteptat am observat o creștere a numărului mediu de mitoze atipice și a pleomorfismului cito-nuclear odată cu gradul KIN ($p < 0.001$). În lotul studiat, analiza subtipului histologic a relevat prezența următoarelor subtipuri: KA hipertofică (37.50%), KA atrofică (34.38%), KA bowenoidă (18.75%) și KA lichenoidă (19.38%), cu incidență ușor crescută a primelor două categorii în rândul femeilor și a ultimelor două categorii la bărbați. Deși fără semnificație statistică, probabil și în contextul în care s-a lucrat cu un lot relativ mic de pacienți, este de menționat tendința de asociere a subtipului histologic bowenoid, care prezintă displazie severă,²⁷ cu o dimensiune crescută a leziunilor, 66.66% dintre acestea având dimensiune mai mare sau egală cu 1 cm.

Așa cum era de așteptat, am regăsit la toți pacienții markeri ai îmbatrânirii tegumentare determinate de RUV precum elastoza solară și inflamația. Toate KA incluse în studiu au prezentat modificări de elastoza solară asociată, în diverse grade de severitate (50% - severitate marcată, 34.37% - severitate moderată și 15.63% severitate redusă). Severitatea elastozei solare s-a corelat cu regiunea anatomică în care se găsește leziunea, fiind mai accentuată în leziunile din regiunea capului și gâtului, regiunea cu cea mai mare

expunere cronică la RUV, unde mai mult de jumătate dintre leziuni (57.69%) au avut elastoza solară marcată asociată ($p= 0.048$). Datele sugerează astfel o corelație între gradul de expunere cumulată la radiații UV și severitatea modificărilor produse de acestea la nivelul tegumentului, fiind în conformitate cu literatura de specialitate.²⁸

În ceea ce privește infiltratul inflamator, prezența sa este menționată în toate cazurile, cu componență limfo-plasmocitară în 90.63% dintre leziuni. Dacă vorbim de evaluarea sa cantitativă, cazurile cu severitate moderată (46.88%) au fost majoritare, urmând în ordine descrescătoare cazurile cu severitate marcată (31.25%) și respectiv redusă (21.88%). Analiza asocierii sale cu gradul KIN a relevat faptul că niciun pacient cu grad KIN III nu a prezentat infiltrat inflamator de severitate redusă. Legătura dintre intensitatea infiltratului inflamator și severitatea displaziei este astfel evidențiată și în prezentul studiu, deslușirea relației intricate dintre cele două fiind considerată esențială de numeroși cercetători pentru stabilirea prognosticului și managementului optim al leziunilor.

7. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL CARCINOM SPINOCELULAR - REZULTATE ȘI DISCUȚII

Incidența CSC cutanat este în continuă ascensiune în ultimele decenii, înregistrând creșteri semnificative cu înaintarea în vârstă. Date epidemiologice indică o prevalență a acestor tumori de 5-10 ori mai ridicată începând cu decada a 7-a de viață, față de grupele de vârstă mai mică.^{29,30} Analiza distribuției cazurilor pe decade de vârstă în lotul studiat a relevat rezultate similare celor din literatură, arătând o creștere progresivă a numărului de cazuri pe măsura înaintării în vârstă, decada cea mai interesată de prezența leziunilor fiind 70-79 ani (18/31 cazuri - 56.25%), urmată de decada 80-89 ani (9/32 cazuri - 28.13%), în timp ce sub 70 ani au fost înregistrate doar 5 cazuri. Ca și în cazul KA, trendul ascendent al incidenței leziunilor remarcat odată cu înaintarea în vârstă și frecvența ridicată de apariție a manifestărilor clinice după vârstă de 70 ani sunt explicate prin efectul cumulativ al expunerii individului la RUV de-al lungul vieții.^{31,32} Sexul masculin este menționat în literatură ca factor de risc pentru dezvoltarea acestor tumori, cu o valoare a *sex ratio* bărbați:femei de 3:1.³³ Factori comportamentali (compliance mai redusă în aplicarea cremelor filtru ecran) sau genetici (frecvența mai ridicată a alopeciei, care favorizează expunerea permanentă a scalpului la RUV în plan orizontal) explică parțial acest fenomen.²² În cazul studiului de față, asocierea sexului masculin cu frecvența de apariție crescută a leziunilor se păstrează sub vârsta de 70 ani, când 4/5 tumori (80%) au fost identificate la bărbați. Peste vârsta de 70 ani însă, două treimi dintre cazuri au fost identificate la sexul feminin. Adresabilitatea crescută la medic a femeilor, influențată probabil și de impactul estetic al leziunilor, precum și speranța de viață mai mare a acestora explică diferența dintre datele obținute în acest studiu și literatura de specialitate. În plus numărul redus de pacienți și perioada relativ scurtă de timp pe care studiul a fost desfășurat pot contribui suplimentar la diferențele obținute în rezultate.

În marea majoritate, CSC din lotul analizat au fost localizate la nivelul regiunii anatomice cap și gât (68.8%), urmând în ordinea descrescătoare a frecvenței membrele (față dorsală mână sau gambă) (21.9%) și trunchiul (presternal) (3.1%). Distribuția este similară datelor din literatură, unde se raportează dezvoltarea tumorilor cu precădere în arii cutanate expuse cronic radiațiilor UV, precum fața, gâtul, urechea, scalpul sau membrele.⁶ Jumătate dintre leziunile din regiunea cap și gât au fost situate la nivelul obrazului, deși ne-am fi așteptat ca nasul, cea mai expusă zonă a corpului, indiferent de comportamentul

vestimentar, să fie cel mai afectat. În ceea ce privește membrele, 85.71% tumori au fost localizate pe fața dorsală a mâinilor. Localizarea la nivelul urechii sau buzelor este considerată zonă anatomică cu risc crescut, tumorile prezente la acest nivel având rată de recurență de 5% respectiv 2% după chirurgia Mohs, 19% respectiv 11% după tehnici non-Mohs și risc de metastazare la 5 ani de follow-up de 9% respectiv 14%.⁹ Lotul studiat nu a inclus leziuni situate pe buză, comportamentul imunologic fiind diferit în tumorile de la nivelul mucoaselor și semimucoaselor, dar a inclus un caz de CSC la nivelul urechii.

Date din literatura de specialitate estimează că aproximativ 60% dintre CSC cutanate se formează pe KA preexistente,^{34,35} rezultate ce se confirmă și în studiul de față, unde 19/32 cazuri (59.4%) CSC au prezentat leziuni de KA adiacente. Un alt aspect de importanță al acestui studiu este faptul că în mai puțin de o treime dintre cazuri CSC a fost suspectat clinic, fiind luată în calcul ca diagnostic diferențial la internare (9/32 cazuri - 28.13%). În restul de 23/32 (71.87%) cazuri diagnosticul initial a fost neconcordanț cu rezultatul histopatologic, 12 dintre aceste cazuri având diagnosticul imprecis formulat („formațiune tumorală”). În lotul analizat, EBC pare să fie principala leziune ce a pus probleme de diagnostic diferențial clinic, prezența sa fiind supectată în nu mai puțin de 13/32 cazuri (40.625%), urmată de melanom (3/32 cazuri - 9.38%), KA (2/32 cazuri - 6.25%) și lentigo simplex (1/32 cazuri - 3.13%). Așadar, conform rezultatelor obținute, EBC este o patologie esențială în diagnosticul diferențial al CSC, iar numărul mare de diagnostice incerte/neconcordante cu rezultatul final al investigațiilor susține importanța examenului histopatologic, standardul de aur în diagnosticarea corectă a oricărei patologii tumorale cutanate.

Conform *American Joint Committee On Cancer* (AJCC) ediția a 8-a, diametrul tumoral este principala caracteristică a tumorii primare de care se ține cont în stadializarea CSC, tumorile fiind clasate T1 dacă au diametrul tumoral maxim sub 2 cm, T2 când diametrul tumoral este ≥ 2 cm și < 4 cm și T3 în cazul unui diametru tumoral maxim ≥ 4 cm.¹² Datele prezente în literatura de specialitate la momentul actual indică, totodată, diametrul tumoral ≥ 2 cm ca fiind o caracteristică tumorală importantă asociată cu risc crescut de comportament biologic agresiv în cazul CSC.^{9,36-38} În lotul studiat, mai mult de jumătate dintre tumori (56.66%) au fost identificate în stadiul inițial - T1, având dimensiuni sub 2 cm, 40% în stadiul T2 și doar 3.33% dintre ele într-un stadiu avansat - T3. Astfel, majoritatea CSC au fost identificate în stadii timpurii, aspectul inestetic al leziunilor, localizarea preponderent în arii vizibile inspecției, la nivelul capului, gâtului și

feței dorsale a mânilor, numărându-se probabil printre motivele ce determină pacienții spre să apeleze la medic în stadii mai precoce ale leziunii.

Analizând comparativ diverse aspecte clinice ale leziunilor din lotul CSC versus KA am observat că leziunile ≥ 1 cm au fost de 2 ori mai numeroase în cazul pacienților din lotul CSC comparativ cu cei din lotul KA ($p=0.001$). (Figura 7.1) Astfel, pragul de 1 cm ar putea reprezenta un semnal de alarmă suplimentar în ceea ce privește criteriile de diferențiere clinice ale KA vs CSC, așa cum este semnalat și de către alți autori.²⁶ În plus, pe loturile analizate, ulcerările la nivelul leziunilor apar mai frecvent în cazul CSC față de KA (46.9% versus 3.1%) ($p<0.001$), pledând în favoarea efectuării biopsiei cutanate în cazurile de KA ulcerate, conform datelor din literatură, pentru excluderea transformării în CSC invaziv.²⁶

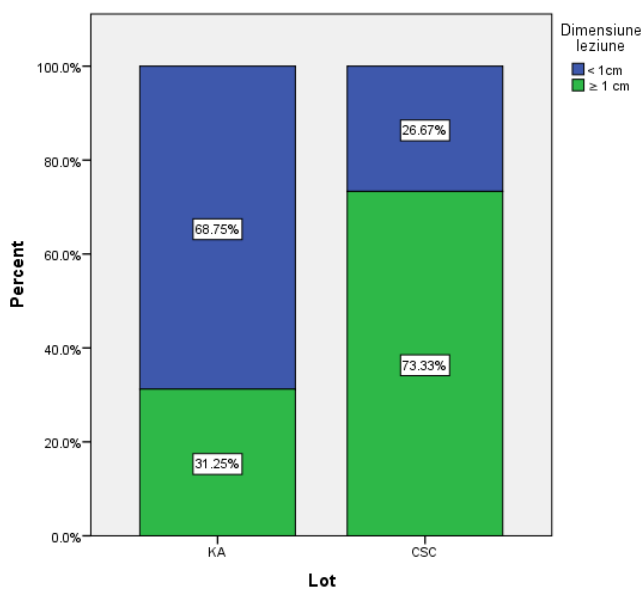


Figura 7. 1. Distribuția cazurilor din loturile keratoză actinică versus carcinom spinocelular în funcție de dimensiunea leziunilor

În ceea ce privește principalele modificări histopatologice întâlnite în CSC, m-am oprit cu precădere asupra celor considerate markeri histologici de prognostic și anume: gradul de diferențiere, subtipul histologic al tumorii, grosimea tumorală maximă, nivelul de invazie în profunzime, asocierea invaziei limfo-vasculare, perineurale sau a necrozei intratumorale. În plus, am evaluat mitozele atipice și pleomorfismul cito-nuclear al celulelor tumorale, tipul și severitatea infiltratului inflamator intratumoral peritumoral, precum și severitatea elastozei solare asociate. Scorul creat de Broders în 1921,³⁹ împarte CSC în patru grade histologice, în funcție de proporția de celule tumorale cu diferențiere keratinocitară din componența sa: grad 1 (CSC bine diferențiat), grad 2 (CSC moderat

diferențiat), grad 3 (slab diferențiat), grad 4 (CSC nediferențiat). Tumorile cu grad slab de diferențiere histologică se asociază cu triplarea ratei de recurență locală și dublarea riscului de metastazare față de formele bine diferențiate, diferențierea slabă fiind considerată factor de prognostic negativ.⁴⁰ În studiul de față, majoritatea CSC (78.1%) au fost moderat diferențiate, 12.5% bine diferențiate și 9.4% slab diferențiate. În practica curentă, încadrarea tumorilor într-un anumit grad histologic este apreciată nu doar în baza proporției de celule cu diferențiere keratinocitară prezente, ci și prin evaluarea pleomorfismului cito-nuclear al acestora, numărului de mitoze și a prezenței globilor cornoși. Rezultatele prezentului studiu sunt în concordanță cu această practică, severitatea pleomorfismului cito-nuclear fiind corelată cu gradul de diferențiere al tumorilor ($p=0.002$). Deși multe dintre tumorile slab diferențiate au prezentat un număr de mitoze semnificativ crescut față de cele moderat și bine diferențiate, corelația nu prezintă semnificație statistică, probabil și din cauza numărului relativ redus de cazuri evaluate și a profilului tumorilor, care au fost predominant bine/moderat diferențiate. Activitatea mitotică intensă a CSC slab diferențiate este sugestivă pentru prognosticul nefavorabil al acestuia în termeni de recidivă locală și metastazare la distanță. Pe lotul evaluat, am remarcat corelarea diametrului tumoral cu gradul de diferențiere, existând o preponderență mai mare a CSC cu un diametru tumoral ≥ 2 cm asociate cu un grad slab de diferențiere, și o frecvență mai mare a tumorilor cu diametrul tumoral < 2 cm în cazul CSC bine diferențiate ($p=0.038$). Niciuna dintre tumorile slab diferențiate nu a avut diametru tumoral sub 2 cm. Astfel, ne putem aștepta în practica curentă ca o tumoră ce nu depășește 2 cm să prezinte grad de diferențiere bun sau moderat, având de obicei prognostic favorabil.

Numeroase subtipuri histologice de CSC sunt descrise în literatura de specialitate.⁴¹ În lotul studiat se remarcă predominanța cazurilor de *CSC not otherwise specified* (84.4%), restul cazurilor fiind de *CSC cu aspect verucos* (12.5%) și *CSC acantolitic* (3.1%). În CSC cu aspect verucos am observat o frecvență de asociere mai mare cu un grad mare de diferențiere, față de celelalte subtipuri histologice ($p<0.001$). În plus, studiul de față a relevat o corelație între acest subtip histologic și localizarea la nivelul membrelor, îndeosebi pe fața dorsală a mâinii ($p=0.011$). În ceea ce privește CSC acantolitic, lotul analizat a inclus un singur astfel de caz, tumora fiind slab diferențiată.

Alți parametri luați în considerare în evaluarea prognosticului CSC sunt grosimea tumorală și nivelul de invazie, aceștia având valoare predictivă pozitivă pentru riscul de recurență locală și de metastazare. Astfel, tumorile cu o grosime mai mare de 2 mm,

prezintă risc de 10 ori mai mare de recurență locală.⁴² În lotul de față, tumorile au avut valori ale grosimii cuprinse între 0.7 mm și 28.29 mm, cu o valoare medie de 5.24 mm, observându-se o creștere semnificativă a grosimii tumorale odată cu creșterea în diametru a tumorii. Astfel leziunile cu diametru tumoral ≥ 2 cm se asociază cu o grosime tumorală mai mare, față de cele cu diametru < 2 cm (grosimea tumorală medie 7.81 mm vs 3.64 mm) ($p=0.008$). În ceea ce privește nivelul de invazie, unii autori privesc adâncimea tumorală ce atinge dermul profund ca factor de prognostic nefavorabil,⁴³ în timp ce alte studii asociază un nivel de invazie dincolo de grăsimea subcutanată, cu pătrundere la nivelul țesutului muscular cu risc de 11 ori mai crescut de metastazare față de tumorile superficiale.⁴² În lotul studiat am observat o frecvență crescută a tumorilor profunde, 56.25% atingând dermul profund, 21.875% grăsimea subcutanată și 18.75% țesutul muscular striat, în timp ce tumorile superficiale, cu adâncime până în dermul superficial au reprezentat doar 3.125% dintre leziuni. Așa cum era de așteptat, am remarcat o creștere a grosimii tumorale odată cu creșterea nivelului de invazie ($p=0.012$). Totodată, este important de menționat faptul că în rândul tumorilor ce penetrează epidermul până la nivelul țesutului muscular striat, cele cu diametru tumoral ≥ 2 cm sunt de 3 ori mai frecvente decât cele sub 2 cm. În plus, singura leziune superficială a avut diametrul < 2 cm.

Invazia limfo-vasculară este propusă de *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) ca factori de prognostic negativ în CSC cutanate.¹³ Aceasta a fost detectată la 3 dintre tumorile din lotul analizat. Tumorile cu invazie intravasculară prezentă au avut o grosime tumorală de 4 ori mai mare decât cele fără invazie limfo-vasculară ($p=0.009$). În plus, am observat o frecvență mai ridicată a invaziei limfo-vasculare în tumorile cu grad slab de diferențiere, comparativ cu cele moderat/bine diferențiate ($p=0.002$). 2/3 dintre tumorile cu invazie perineurală prezentă, (66.66%) au prezentat invazie perineurală și invazie limfo-vasculară asociate.

La fel ca și în cazul KA și similar datelor din literatura de specialitate, elastoza solară și inflamația peritumorală asociată au fost regăsite la toți pacienții, ca markeri ai îmbatrânirii tegumentare determinate de RUV. CSC au fost asociate cu elastoza solară în diverse grade de severitate, mai mult de jumătate dintre leziuni (53.13%) prezentând modificări dermice sugestive pentru elastoza solară marcată. În majoritatea tumorilor (75%) componența infiltratului inflamator peritumoral a fost limfo-plasmocitară, iar restul cazurilor (25%) au asociat infiltrat inflamator polimorf (limfocite, plasmocite, neutrofile și eozinofile). Am remarcat în cazul elastozei solare marcate o tendință mai mare de asociere

cu un infiltrat inflamator marcat. Studiul de față demonstrează implicarea agresiunii actinice cronice în apariția modificărilor tegumentare peritumorale. Cercetătorii în domeniu acordă o importanță deosebită legăturii dintre micromediul inflamator peritumoral și oncogeneza cancerelor cutanate keratinocitare. Cu toate acestea nu s-a demonstrat încă cu certitudine dacă acest microclimat participă activ la transformarea tumorală malignă sau reprezintă modul organismului de a reacționa și de a limita expansiunea tumorală, acest aspect fiind intens dezbătut în ultimii ani.

8. CARACTERIZAREA IMUNOHISTOCHEMICALĂ A LOTURILOR - REZULTATE ȘI DISCUȚII

Aprofundarea mecanismelor oncogenezei în CSC și identificarea unui profil imunologic individualizat, care să permită o mai bună stratificare a pacienților în conformitate cu riscul lor de evoluție nefavorabilă sunt esențiale în încercarea de a optimiza clasificările actuale și a utiliza o terapie mai eficientă, personalizată pentru fiecare pacient în parte. Unul dintre aceste mecanisme ale oncogenezei este tranziția epitelial-mezenchimală (TEM), un proces biologic complex, în care celulele epiteliale pierd moleculele de adeziune care le mențineau unite, căpătând fenotip mezenchimal, cu creșterea motilității și a capacității de invazie.⁴⁴ Pierderea expresiei E-caderinei, receptor de adeziune celulară, contribuie la progresia tumorală în multe tipuri de cancere la om, între care și EBC sau melanomul.⁴⁴ Așa cum am arătat într-un articol tip review publicat pe această temă în 2019,⁴⁴ rolul TEM în progresia KA și a CSC cutanat nu este însă pe deplin elucidat, studii cu rezultate contradictorii, cu o creștere a expresiei E-caderinei atât în CSC cât și în metastazele cutanate ale acestuia punând la îndoială rolul acestui mecanism în patogeniza tumorilor keratinocitare.⁴⁵ Am investigat în prezentul studiu rolul TEM în progresia tumorilor keratinocitare. Analizând diferențele de expresie ale E-caderinei comparativ în cele trei loturi, am obținut rezultate similare celor din literatură,^{46,47} cu evidențierea unei diminuări ale proporției și intensității celulelor pozitive pentru E-caderină în masa tumorală a carcinoamelor spinocelulare în comparație cu leziunile lor precursorare, keratozele actinice, dar și cu tegumentul indemn ($p=0.001$).

Totodată, am demonstrat că proporția și intensitatea celulelor pozitive pentru E-caderină variază în carcinoamele spinocelulare în funcție de aria tumorală examinată, rezultatele fiind publicate în cadrul cercetării de studii doctorale.⁴⁸ Astfel, atât proporția de celule pozitive pentru E-caderină, cât și intensitatea expresiei acesteia au fost semnificativ crescute în masa tumorală versus frontul de invazie tumoral ($p < 0.0001$).⁴⁸ Modificările de expresie de la nivelul frontului invaziv, compus din ultimele 3-6 rânduri de celule, situate la cel mai adânc nivel de invazie tumorală, indică faptul că pierderea caracteristicilor epiteliale în cadrul TEM crește capacitatea de invazie în CSC.⁴⁸

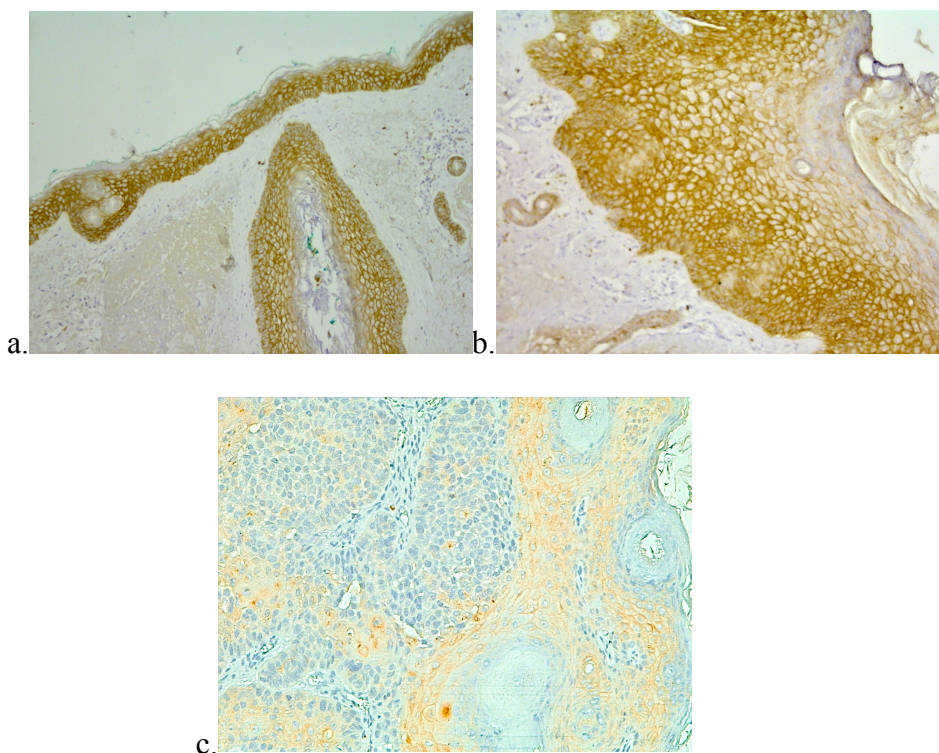


Figura 8. 1. Expresia comparativă a E-caderinei în cele trei loturi analizate: a – expresia E-caderinei la nivelul lotului control (ob 5x) și b - expresia E-caderinei într-o keratoză actinică (ob 10x) - observăm în ambele cazuri atât o intensitate crescută a expresiei, cât și o proporție ridicată de celule pozitive pentru E-caderină; c – expresie zonală diminuată a E-caderinei în masa tumorală a unui carcinom spinocelular, ob 20x (Sursa: arhiva Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina, București)

Referitor la N-caderină am găsit foarte puține date în literatură, deoarece foarte puține studii au inclus CSC în studiul acesteia. Există autori care au demonstrat că expresia sa intens pozitivă la nivel nuclear se asociază cu un fenotip agresiv în carcinoamele spinocelulare orale, fiind asociată cu tendință crescută pentru invazie loco-regională, metastazare și rată redusă de supraviețuire.⁴⁹ În studiul de față, niciuna dintre leziunile evaluate nu a prezentat pozitivitate pentru N-caderină. O posibilă explicație ar fi faptul că majoritatea CSC incluse în studiu a fost alcătuită din tumori bine sau moderat diferențiate, fără caracteristici de agresivitate crescută. Deși în alte tipuri de cancere cutanate, în special în melanom, N-caderina este un marker consacrat de invazivitate,^{44,50} rolul său în evaluarea progresiei tumorilor keratinocitare cutanate rămâne limitat, studii suplimentare fiind necesare pentru a aprecia implicarea moleculei în aceste malignități.

Un alt mecanism studiat a fost implicarea celulelor dendritice Langerhans (CL), CD1a pozitive, în modularea comportamentului tumoral. Este recunoscut rolul acestora în reglarea balanței dintre imunitate și toleranță imună periferică, iar dezechilibrele lor pot conduce la patologii variate, între care și cancerele de piele.⁵¹ Densitatea scăzută de celule

dendritice este propusă ca factor de prognostic negativ în evoluția unor tumori solide precum CSC laringian sau cancerul mamar.^{52,53} La nivelul tegumentului, expunerea cronică la RUV, în special UVB, duce la scăderea numărului de celule dendritice cutanate și la modificări morfologice ale acestora.⁵⁴⁻⁵⁶ În ceea ce privește tumorile keratinocitare, studii comparative pe diverse cancere cutanate și leziuni precanceroase au arătat că numărul de CL care exprimă CD1a este semnificativ redus în EBC și CSC cutanat față de keratoza actinică și tegumentul indemn.⁵⁷ Similar datelor din literatură, în studiul efectuat, am demonstrat că valorile procentuale medii ale celulelor CD1a pozitive din lotul CSC sunt aproape de trei ori mai scăzute comparativ cu cele din loturile KA, respectiv control ($p < 0.001$). Scăderea numărului de CL, celule ce alcătuiesc prima linie de apărare imunologică a tegumentului, cu rol în detecția, fagocitarea și procesarea antigenelor exogene, sugerează o diminuare a răspunsului imunologic în aceste cancere cutanate. Spre deosebire de alte subtipuri de celule dendritice prezentatoare de antigen, CL posedă o biologie unică, putând fi activate pentru a stimula imunitatea antitumorală tip 1 atât după cultivare *in vivo* cât și după generare *in vitro*.⁵⁸ Adiția de CL astfel activate în mediile tumorale în care sunt deficitare sau sunt compromise din punct de vedere funcțional ar putea fi exploatată în viitor spre avantajul terapeutic pentru a induce un efect antitumoral în CSC cutante.

În ceea ce privește micromediul peritumoral inflamator, este bine cunoscut faptul că celulele și mediatorii inflamației pot avea comportament dual, putând stimula progresia tumorală sau desfășura activitate antitumorală.⁵⁹⁻⁶¹ Caracterizarea amănunțită a mecanismelor și moleculelor inflamatorii cu rol în carcinogeneză rămâne un demers esențial în încercarea de a identifica noi ținte terapeutice antitumorale. CD5 este o moleculă inhibitorie a *T-cell receptor* (TCR) și *B-cell receptor* (BCR), cu rol important în modularea răspunsului imun anti-tumoral, fiind exprimată în principal pe celule T mature, dar și pe unele subtipuri de limfocite B.⁶²⁻⁶⁵ Studii *in vivo* bazate pe modelul B16 de melanom au demonstrat întârzierea creșterii tumorilor la șoarecii CD5 - deficienți comparativ cu cei sălbatici CD5 +.⁶⁶ În studiul de față, CD5 a fost exprimat peritumoral difuz în toate cazurile de CSC, fiind concentrat în apropierea frontului de invazie și a avut expresie difuză sau focală perilezional în toate KA. Deși am observat unele variații de intensitate ale CD5 între loturi, cu tendința de a fi mai bine exprimat în CSC, din punct de vedere statistic acestea nu sunt semnificative, probabil și din cauza subiectivismului în ceea ce privește aprecierea gradului de intensitate. În plus, am remarcat o creștere a valorii

medii CD5 peritumoral pe măsură ce gradul de diferențiere al CSC este mai mare.

Rolul limfocitelor B (LB) în dezvoltarea și progresia cancerelor este incomplet elucidat, presupunându-se că activitatea lor antitumorală se desfășoară prin identificarea unor antigene asociate tumorilor și secreție de anticorpi antitumorali specifici.⁶⁷ Numărul crescut de limfocite B CD20+ în micromediul tumoral este considerat ca factor de prognostic pozitiv, corelat cu supraviețuire ridicată în cancerul de sân, esofagian sau în cancerul pulmonar fără celule mici, în timp ce în alte cancere solide nu s-au găsit corelații între prezența acestor celule și prognosticul tumoral.⁶⁷⁻⁷⁰ În CSC orale, numărul de celule CD20+ este invers corelat cu dezvoltarea metastazelor ganglionare și scade cu creșterea gradului de anaplazie.^{67,71} În cercetarea de față, expresia CD20 perilezional a fost mai crescută în CSC față de KA (p=0.011). Analizând expresia CD20 în funcție de prezența ulceratiilor microscopice sau a agenților microbieni în suprafața leziunilor, factori care puteau declanșa stimularea antigenică cu atracția LB în lipsa antigenelor specifice tumorale, nu am găsit asocieri semnificative statistic pozitive între intensitatea CD20 și variabilele menționate în niciunul dintre grupurile studiate. În grupul CSC, expresia crescută a CD20 peritumoral s-a asociat cu un diametru tumoral ≥ 2 cm (p=0.006) și am observat o creștere a expresiei peritumorale a CD20 odată cu creșterea numărului de mitoze (p=0.011), a grosimii tumorale (p=0.014) și a expresiei CD11c (p=0.018). Sunt necesare studii suplimentare pentru a stabili utilitatea practică a CD20 în leziunile cu punct de pornire keratinocitar.

Expresia scăzută a CD11c în diverse cancere se corelează cu infiltrarea redusă a acestora cu celulele efortorii, promovând accentuarea creșterii tumorale.⁷²⁻⁷⁴ În leziunile de la nivelul mucoasei gastrice, expresia CD11c este mult crescută în cancerul gastric, față de gastrită sau polipi gastrici.⁷⁵ Expresia CD11c în cancerul gastric scade însă în stadiile tumorale mai avansate și este propusă ca factor de risc pentru recurență și mortalitate.⁷⁵ Cuantificarea celulelor CD11c pozitive numără diverși efectori din micromediul tumoral printre care macrofagele, anumite subseturi de celule dendritice și celule NK.⁷⁶ În studiul de față, celulele CD11c pozitive au fost dispuse în interiorul tumorilor, la nivelul frontului de invazie și în acumulări perimetrice insulelor invazive, în contact direct cu celulele tumorale în cazul CSC, având expresie similară în loturile KA și CSC.

Așa cum am descris anterior,⁷⁷ referitor la CEACAM1 există date limitate în literatură, deoarece foarte puține studii au inclus CSC în studiul acestei molecule. Marea

majoritate a cercetărilor efectuate în cancerile de piele face referire la melanom, tumoră în care supraexpresia CEACAM1 apare frecvent în stadii avansate, fiind asociată cu invazivitate crescută și metastazare.⁷⁸ În CSC oral comportamentul tumoral variază în funcție de localizarea moleculei în cadrul celulelor tumorale, expresia membranară a CEACAM1 fiind asociată cu CSC bine diferențiat, în timp ce expresia citoplasmatică este întâlnită cu precădere în CSC cu grad de diferențiere moderat și slab, stimulând proliferarea vasculară și limfangiogeneza.⁷⁹ În studiul de față, expresia CEACAM1 a fost negativă în loturile KA și control, precum și în 71.9% dintre CSC cutanate. În restul tumorilor, expresia CEACAM1 a fost variabilă, în funcție de aria tumorală examinată. Astfel, în zonele cu tendință la formare de perle keratozice intratumorale am observat expresie membranară, în timp ce frontul de invazie și restul tumorii au avut expresie negativă. Rezultatele studiului de față pot sugera o corelație între prezența expresiei membranare a CEACAM1 și gradul crescut de diferențiere tumorală. Studii suplimentare sunt necesare pentru a stabili o corelație clară.

9. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

9.1. CONCLUZII

9.1.1. LOT KERATOZĂ ACTINICĂ

- ✓ Incidența keratozelor actinice a crescut cu înaintarea în vârstă, atingând un maxim în intervalul de vârstă de 70-79 de ani, leziunile fiind mai frecvent diagnosticate la sexul feminin, probabil din cauza adresabilității crescute la medic a femeilor;
- ✓ Cea mai frecventă localizare a keratozelor actinice a fost în regiunea anatomică cap și gât, în special la nivelul obrazului, fiind explicată prin expunerea frecventă a acestei zone la radiații ultraviolete, pe tot parcursul anului. Cazurile cu localizare extrafacială au fost fiind mai des întâlnite în rândul bărbaților;
- ✓ Majoritatea keratozelor actinice au avut dimensiuni mici, de sub 1 cm, așa cum sunt de obicei descrise în literatura de specialitate, iar dintre leziunile mai mari de 1 cm, cele mai multe au fost depistate la bărbați. Diferența între sexe în ceea ce privește prezentarea la medic accentuată de aspectul inestetic al KA preponderent faciale în cazul femeilor, le motivează cel mai probabil pe acestea spre cererea unei consultații în stadii mai precoce ale leziunilor;
- ✓ Mai puțin de jumătate dintre keratozele actinice au fost corect diagnosticate clinic, principalele problemele de diagnostic diferențial fiind cancerul cutanat keratinocitar, epiteliomul bazocelular și carcinomul spinocelular. Rezultatele obținute indică necesitatea stabilirii unui set de criterii clinice extinse, care să crească gradul de suspiciune clinică în aceste leziuni și să ghideze cu mai mare precizie cazurile ce necesită efectuarea exciziei cu examinare histopatologică, reducând astfel morbiditatea asociată și impactul estetic și funcțional în cazul KA care ar putea beneficia de tratament conservator;
- ✓ În ceea ce privește subtipul histologic, în lotul de studiu am întâlnit, în ordine descrescătoare a frecvenței: KA hipertofice, KA atrofile, KA lichenoide și KA bowenoide. Subtipul histologic bowenoid, considerat a avea cel mai înalt grad de displazie, a prezentat tendință de asociere cu o dimensiune a leziunilor ≥ 1 cm;
- ✓ Profilul morfologic al tegumentului perilezional keratozelor actinice a evidențiat în toate cazurile mărci ale agresiunii actinice cronice, cu prezența unui infiltrat

inflamator limfo-plasmocitar de severitate variabilă și modificări de elastoza solară asociate. Severitatea elastozei solare asociate keratozelor actinice a fost mai accentuată în regiunea capului și gâtului, corelându-se cu gradul de expunere cumulativă la radiații ultraviolete.

9.1.2. LOT CARCINOM SPINOCELULAR

- ✓ Incidența CSC a crescut odată cu înaintarea în vârstă, atingând un maxim în intervalul 70-79 de ani, observându-se o predominanță a leziunilor la sexul masculin înainte de 70 ani și la cel feminin după această vârstă;
- ✓ Majoritatea leziunilor au fost localizate în regiunea anatomică cap și gât, jumătate dintre acestea fiind situate la nivelul obrazului. Următoarea regiune anatomică afectată a fost cea a membrilor, peste două treimi dintre tumorile din această categorie fiind localizate pe fața dorsală a mâinilor. Distribuția este similară datelor din literatură și este explicată prin expunerea frecventă a acestor zone la radiații ultraviolete pe tot parcursul anului;
- ✓ Leziunile ce depășesc 1 cm au fost de 2 ori mai numeroase în cazul CSC comparativ cu KA, iar leziunile ulcerate macroscopic au fost mult mai frecvente în cazul carcinoamelor spinocelulare față de keratozele actinice. Ambele caracteristici ar putea reprezenta un semnal de alarmă în ceea ce privește criteriile de diferențiere clinice ale acestor leziuni keratinocitare, pledând în favoarea efectuării biopsiei cutanate în cazurile de keratoze actinice mai mari de 1 cm și ulcerate, pentru excluderea transformării în carcinom spinocelular invaziv;
- ✓ Similar rezultatelor din alte studii, peste jumătate dintre CSC s-au dezvoltat pe leziuni adiacente de KA, date ce sugerează calitatea de leziune precursoră a acesteia din urmă;
- ✗ Mai puțin de o treime dintre CSC au fost corect diagnosticate clinic, fapt ce subliniază importanța examenului histopatologic în stabilirea diagnosticului de certitudine al acestor tumori cutanate ce îmbracă aspecte clinice foarte variate. Principala problemă de diagnostic diferențial a fost epiteliomul bazocelular;
- ✓ Majoritatea tumorilor au fost identificate în stadii inițiale (T1 - diametru tumoral maxim sub 2 cm); Carcinoamele spinocelulare aflate într-un stadiu mai avansat, având un diametru tumoral mai mare de 2 cm, s-au asociat cu alte caracteristici de agresivitate precum un grad slab de diferențiere și o grosime tumorală mai mare;

- ✓ În ceea ce privește subtipul histologic, în lotul de studiu am întâlnit, în ordine descrescătoare a frecvenței: CSC *not otherwise specified*, CSC cu aspect verucos și CSC acantolitic; CSC cu aspect verucos a fost asociat cu un grad mare de diferențiere și cu localizarea la nivelul feței dorsale a mâinii;
- ✓ Analizând diverse alte caracteristici de agresivitate crescută și relația dintre acestea, am observat o asocieră între prezența invaziei limfo-vasculare și o grosime tumorală mai mare, precum și o frecvență mai ridicată de apariție a invaziei limfo-vasculare în tumorile cu grad slab de diferențiere;
- ✓ Profilul morfologic al tegumentului perilezional a evidențiat în toate cazurile mărci ale agresiunii actinice cronice, cu prezența unui infiltrat inflamator limfoplasmocitar în majoritatea cazurilor, de severitate variabilă și modificări de elastoza solară asociate. Elastoza solară marcată a fost mai frecvent asociată cu un infiltrat inflamator marcat.

9.1.3. PARAMETRI IMUNOHISTOCHEMICI

- ✓ În ceea ce privește TEM, am demonstrat scăderea expresiei E-caderinei în masa tumorală a carcinoamelor spinocelulare în comparație cu leziunile lor precursoră, keratozele actinice, dar și cu tegumentul indemn. De asemenea, am observat în lotul CSC o variație intensității și proporției de celule pozitive pentru E-caderină în funcție de aria din tumoră examinată; astfel, atât proporția de celule pozitive pentru E-caderină, cât și intensitatea expresiei au fost semnificativ crescute în masa tumorală versus frontul de invazie tumoral, indicând faptul că pierderea caracteristicilor epiteliale în cadrul TEM crește capacitatea de invazie în aceste tumori;
- ✓ Rolul N-caderinei în evaluarea progresiei tumorilor keratinocitare cutanate rămâne limitat, iar studii suplimentare sunt necesare pentru a aprecia implicarea moleculei în evoluția acestor malignități;
- ✓ Scăderea numărului de CL în CSC cutanate comparativ cu leziunile lor precursoră și cu tegumentul indemn sugerează o diminuare a răspunsului imunologic în aceste cancere cutanate; Adăptia de CL activate după cultivare *in vivo* sau generare *in vitro* în mediile tumorale în care sunt deficitare sau sunt compromise din punct de vedere funcțional ar putea fi exploatată în viitor spre avantajul terapeutic pentru a induce un efect antitumoral în CSC cutante;

- ✓ Markerii care evidențiază și diferențiază celulele din componența micromediului inflamator peritumoral, precum CD5, CD20 și CD11c nu fac parte din panelul standard de determinări utilizați pentru aprecierea profilului tumoral în cazul CSC cutanat, deși și - au dovedit utilitatea în evaluarea altor tipuri de cancere la om. În absența unor rezultate publicate în literatura de specialitate, este dificil de tras concluzii ferme cu privire la rolul lor în CSC cutante în acest moment. Din acest punct de vedere, studiul este unul inovativ și ar putea reprezenta premiza pentru cercetări ulterioare. Ele ar trebui corelate în studii viitoare cu evoluția pacienților în studii prospective observaționale, pe loturi mult mai numeroase de pacienți. Odată ce se va stabili relevanța lor în ceea ce privește agresivitatea, invazivitatea și proliferarea tumorală, aceste molecule deja bine cunoscute ar putea deveni ținte atractive folosite în imunoterapia antitumorală;
- ✓ Asocierea dintre expresia membranară a CEACAM1 și gradul crescut de diferențiere tumorală sugerează corelarea acestei localizări a moleculei cu un comportament tumoral lipsit de agresivitate în CSC cutanate. Studii suplimentare sunt necesare pentru a stabili o legătură clară.

9.2. CONTRIBUȚII PERSONALE

În urma studierii literaturii internaționale și naționale de specialitate, în prezentul studiu am realizat, în partea generală, o imagine actualizată, de ansamblu, cu privire la actualele clasificări și ghiduri de management ale leziunilor keratinocitare scuamoase, evidențiind lipsa unor recomandări ferme și a unor criterii de stratificare avansate pentru KA și CSC. Pornind de la nevoia identificării unor ținte prognostice și terapeutice complementare celor actuale, am studiat cele mai importante corelații clinico-patologice în keratoze actinice și carcinoame spinocelulare, leziuni cutanate în a căror patogeneza joacă un rol important expunerea cumulativă la radiații ultraviolete. De asemenea, am caracterizat anumite aspecte considerate importante ale profilului imunologic local în aceste leziuni. Pe lângă utilizarea colorațiilor histopatologice clasice, am efectuat în paralel și tehnici imunohistochemice, acesta fiind unul dintre punctele forte ale studiului. La momentul actual, imunohistochimia face obiectul a numeroase cercetări internaționale, oferind rezultate promițătoare în ceea ce privește progresul în deslușirea mecanismelor carcinogenezei.

Limitarea principală a studiului a constat în dificultatea de a alcătui loturile de lucru, având în vedere că biopsiile prelevate au în general dimensiuni foarte mici în cazul keratozelor actinice, restricționând numărul de studii suplimentare care se pot efectua asupra lor. Astfel, a fost disponibil un număr relativ redus de cazuri în perioada 2013-2015 cu probă prelevată tip rezeecție integrală, la care recoltarea de fragmente pentru imunohistochimie să nu împietzeze rediagnosticarea ulterioară. O altă limitare este lipsa informațiilor cu privire la evoluția clinică ulterioară a pacienților.

În acest studiu am obținut rezultate care atestă ipoteza implicării radiațiilor ultraviolete în carcinogeneza cutanată și am extins cunoștințele asupra trăsăturilor histopatologice și imunohistochimice ce caracterizează keratozele actinice și carcinoamele spinocelulare, identificând cei mai specifici markeri ai evoluției și prognosticului leziunilor. Totodată, am descris o parte dintre mecanismele și markerii ce guvernează invazia și agresivitatea în keratozele actinice și carcinoamele spinocelulare și am evidențiat potențiale ținte terapeutice care în viitor ar putea fi exploatate în imunoterapia antitumorală. Sunt necesare studii suplimentare atât pe model animal, cât și pe model uman, care să se focuseze pe mecanismele descrise. Caracterizarea complexă a KA și CSC a relevat nevoia unor studii viitoare, în care colaborarea dintre dermatologi, fiziologi, anatomopatologi și fiziopatologici este esențială pentru a putea integra profilul imunologic exhaustiv obținut al leziunilor, într-un context care să includă date despre evoluția leziunilor, răspunsul la tratament, rata de recidivă locală, de metastazare la distanță și statusul imunologic sistemic al pacienților, conducând astfel la realizarea unui management optimizat. Astfel, această lucrare aduce o contribuție importantă și deschide noi perspective de cercetare în domeniul carcinogenezei cutanate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ (DIN TOTAL 442 REFERINȚE)

1. Johnson, T. M., Rowe, D. E., Nelson, B. R. & Swanson, N. A. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 467–484 (1992).
2. Muzic, J. G. *et al.* Incidence and Trends of Basal Cell Carcinoma and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clin. Proc.* **92**, 890–898 (2017).
3. Burton, K. A., Ashack, K. A. & Khachemoune, A. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *American Journal of Clinical Dermatology* **17**, 491–508 (2016).
4. Rogers, H. W., Weinstock, M. A., Feldman, S. R. & Coldiron, B. M. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the us population, 2012. *JAMA Dermatology* **151**, 1081–1086 (2015).
5. Kosmadaki, M. G. & Gilchrest, B. A. The demographics of aging in the United States: Implications for dermatology. *Archives of Dermatology* **138**, 1427–1428 (2002).
6. Franceschi, S., Levi, F., Randimbison, L. & La Vecchia, C. Site distribution of different types of skin cancer: New aetiological clues. *Int. J. Cancer* **67**, 24–28 (1996).
7. Khan, K. *et al.* A 5-year follow-up study of 633 cutaneous SCC excisions: Rates of local recurrence and lymph node metastasis. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **71**, 1153–1158 (2018).
8. Alam, M. & Ratner, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **344**, 975–83 (2001).
9. Rowe, D. E., Carroll, R. J. & Day, C. L. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 976–90 (1992).
10. Callen, J. P., Bickers, D. R. & Moy, R. L. Actinic keratoses. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 650–3 (1997).
11. Glogau, R. G. The risk of progression to invasive disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, (2000).
12. *AJCC Cancer Staging Form Supplement AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition.*
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Squamous cell skin cancer. (2018). Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. (Accessed: 10th September 2020)
14. Sanatatii, M. GHID 16/09/2010 - Portal Legislativ. *Monitorul Oficial Nr. 723* (2010). Available at: <http://legislatie.just.ro/Public/DetaliiDocumentAfis/123489>. (Accessed: 21st September 2020)
15. Leslie, D. & Hart, V. Skin cancer in a Queensland population. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**, 1045–1052 (1988).
16. McBride, P., Neale, R., Pandeya, N. & Green, A. Sun-related factors, betapapillomavirus, and actinic keratoses: a prospective study. *Arch. Dermatol.* **143**, 862–8 (2007).
17. Hensen, P. *et al.* Predisposing factors of actinic keratosis in a North-West German

- population. *Eur. J. Dermatol.* **19**, 345–54 (2009).
18. Salasche, S. J. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, (2000).
 19. Trakatelli, M. *et al.* Skin cancer risk in outdoor workers: a European multicenter case-control study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **30 Suppl 3**, 5–11 (2016).
 20. Memon, A. A., Tomenson, J. A., Bothwell, J. & Friedmann, P. S. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *Br. J. Dermatol.* **142**, 1154–9 (2000).
 21. Zagula-Mally, Z. W., Rosenberg, E. W. & Kashgarian, M. Frequency of skin cancer and solar keratoses in a rural southern county as determined by population sampling. *Cancer* **34**, 345–9 (1974).
 22. Flohil, S. C. *et al.* Prevalence of actinic keratosis and its risk factors in the general population: the Rotterdam Study. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1971–8 (2013).
 23. Schwartz, R., Bridges, T., Butani, A. & Ehrlich, A. Actinic keratosis: an occupational and environmental disorder. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **22**, 606–615 (2008).
 24. Roewert-Huber, J., Stockfleth, E. & Kerl, H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br. J. Dermatol.* **157**, 18–20 (2007).
 25. Wang, Y., Hunt, K., Nazareth, I., Freemantle, N. & Petersen, I. Do men consult less than women? An analysis of routinely collected UK general practice data. *BMJ Open* **3**, e003320 (2013).
 26. Padilla & Steven. Epidemiology, natural history, and diagnosis of actinic keratosis - UpToDate. (2019).
 27. Cockerell, C. J. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ('actinic keratosis'). *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, (2000).
 28. Kligman, A. M. Early Destructive Effect of Sunlight on Human Skin. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **210**, 2377–2380 (1969).
 29. Karagas, M. R., Greenberg, E. R., Spencer, S. K., Stukel, T. A. & Mott, L. A. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int. J. cancer* **81**, 555–9 (1999).
 30. Gray, D. T. *et al.* Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch. Dermatol.* **133**, 735–740 (1997).
 31. Schmitt, J., Seidler, A., Diepgen, T. L. & Bauer, A. Occupational ultraviolet light exposure increases the risk for the development of cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* **164**, 291–307 (2011).
 32. Schmitt, J. *et al.* Is ultraviolet exposure acquired at work the most important risk factor for cutaneous squamous cell carcinoma? Results of the population-based case-control study FB-181. *Br. J. Dermatol.* **178**, 462–472 (2018).
 33. Que, S. K. T., Zwald, F. O. & Schmults, C. D. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *Journal of the American Academy of Dermatology* **78**, 237–247 (2018).
 34. Marks, R., Rennie, G. & Selwood, T. S. MALIGNANT TRANSFORMATION OF SOLAR

- KERATOSES TO SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *Lancet* **331**, 795–797 (1988).
35. Criscione, V. D. *et al.* Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer* **115**, 2523–30 (2009).
 36. Brougham, N. D. L. S., Dennett, E. R., Cameron, R. & Tan, S. T. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J. Surg. Oncol.* **106**, 811–5 (2012).
 37. Mullen, J. T. *et al.* Invasive squamous cell carcinoma of the skin: defining a high-risk group. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 902–9 (2006).
 38. Cherpelis, B. S., Marcusen, C. & Lang, P. G. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol. Surg.* **28**, 268–73 (2002).
 39. Broders, A. C. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE SKIN A STUDY OF 256 CASES. *Ann. Surg.* **73**, 141–160 (1921).
 40. Brantsch, K. D. *et al.* Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* **9**, 713–720 (2008).
 41. Waldman, A. & Schmults, C. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **33**, 1–12 (2019).
 42. Thompson, A. K., Kelley, B. F., Prokop, L. J., Murad, M. H. & Baum, C. L. Risk factors for cutaneous squamous cell carcinoma recurrence, metastasis, and disease-specific death: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatology* **152**, 419–428 (2016).
 43. Edge, S. B. & Compton, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 1471–1474 (2010).
 44. Hodoroagea, A. & Calinescu, A. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. *Analytical Cellular Pathology* **2019**, (2019).
 45. Hesse, K. *et al.* Characterisation of Prognosis and Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma by Podoplanin and E-Cadherin Expression. *Dermatology* **232**, 558–565 (2016).
 46. Jang, T. J. Epithelial to mesenchymal transition in cutaneous squamous cell carcinoma is correlated with COX-2 expression but not with the presence of stromal macrophages or CD10-expressing cells. *Virchows Arch.* **460**, 481–487 (2012).
 47. Brembeck, F. H., Rosário, M. & Birchmeier, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Current Opinion in Genetics and Development* (2006). doi:10.1016/j.gde.2005.12.007
 48. Calinescu, A. *et al.* ANALYSIS OF E-CADHERIN EXPRESSION IN A GROUP OF PRIMARY CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMAS. *Rom. J. Clin. Res.* **2**, (2019).
 49. DI Domenico M, P. G. F. A. *et al.* Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma - PubMed. *Anticancer Res.* **31**, 4211–4218 (2011).
 50. Lade-Keller, J. *et al.* E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *Br. J. Dermatol.* **169**, 618–628 (2013).

51. Chopin, M. & Nutt, S. L. Establishing and maintaining the Langerhans cell network. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **41**, 23–29 (2015).
52. Karakök, M. *et al.* Langerhans cell related inflammatory reaction in laryngeal squamous cell carcinoma. *Elsevier*
53. La Rocca, G. *et al.* CD1a down-regulation in primary invasive ductal breast carcinoma may predict regional lymph node invasion and patient outcome. *Histopathology* **52**, 203–212 (2008).
54. Seité, S. *et al.* Alterations in human epidermal Langerhans cells by ultraviolet radiation: quantitative and morphological study. *Br. J. Dermatol.* **148**, 291–9 (2003).
55. Townsend, W. L., Gorrell, M. D. & Mayer, R. Langerhans cells in the development of skin cancer: a qualitative and quantitative comparison of cell markers in normal, acanthotic and neoplastic ovine skin. *Pathology* **29**, 42–50 (1997).
56. Alcalay, J., Goldberg, L. H., Wolf, J. E. & Kripke, M. L. Variations in the number and morphology of Langerhans' cells in the epidermal component of squamous cell carcinomas. *Arch. Dermatol.* **125**, 917–20 (1989).
57. Shevchuk, Z., Filip, A., ... V. S.-E. & 2014, undefined. Number of Langerhans cells is decreased in premalignant keratosis and skin cancers. *irbis-nbuv.gov.ua*
58. Fujita, H. *et al.* Langerhans cells from human cutaneous squamous cell carcinoma induce strong type 1 immunity. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1645–1655 (2012).
59. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
60. Shrihari, T. G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *ecancermedicalscience* **11**, (2017).
61. Shalapour, S. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 3347–3355 (2015).
62. Huang, H. J. S., Jones, N. H., Strominger, J. L. & Herzenberg, L. A. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: Molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 204–208 (1987).
63. Berland, R. & Wortis, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annual Review of Immunology* **20**, 253–300 (2002).
64. Osman, N., Ley, S. C. & Crumpton, M. J. Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2995–3000 (1992).
65. Beyers, A. D., Spruyt, L. L. & Williams, A. F. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2945–2949 (1992).
66. Tabbekh, M. *et al.* Rescue of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Activation-Induced Cell Death Enhances the Antitumor CTL Response in CD5-Deficient Mice. *J. Immunol.* **187**, 102–109 (2011).
67. Taghavi, N., Mohsenifar, Z., Baghban, A. A. & Arjomandkhah, A. CD20+ tumor

- infiltrating b lymphocyte in oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathologic characteristics and heat shock protein 70 expression. *Patholog. Res. Int.* **2018**, (2018).
68. He, Y. *et al.* The roles of regulatory B cells in cancer. *Journal of Immunology Research* **2014**, (2014).
 69. Martinet, L. *et al.* Human solid tumors contain high endothelial venules: Association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 5678–5687 (2011).
 70. Lundgren, S., Berntsson, J., Nodin, B., Micke, P. & Jirstrom, K. Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in epithelial ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **9**, (2016).
 71. Muzio, L. Lo *et al.* Immunohistochemical expression of CD3, CD20, CD45, CD68 and bcl-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* **32(2)**, 70:7 (2010).
 72. Fahlén-Yrlid, L. *et al.* CD11c high Dendritic Cells Are Essential for Activation of CD4 + T Cells and Generation of Specific Antibodies following Mucosal Immunization . *J. Immunol.* **183**, 5032–5041 (2009).
 73. Choi, B. K. *et al.* Mechanisms involved in synergistic anticancer immunity of anti-4-1BB and anti-CD4 therapy. *Cancer Res.* **67**, 8891–8899 (2007).
 74. Vinay, D. S. & Kwon, B. S. CD11c+CD8+ T cells: Two-faced adaptive immune regulators. *Cellular Immunology* **264**, 18–22 (2010).
 75. Wang, Y. *et al.* High expression of CD11c indicates favorable prognosis in patients with gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 9403–9412 (2015).
 76. Castro, F. V. V. *et al.* CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2263–2273 (2008).
 77. Calinescu, A. *et al.* On the dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in human malignancies. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).
 78. Thies, A. *et al.* CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2530–2536 (2002).
 79. Zhou, C.-J. *et al.* CEACAM1 distribution and it's effects on angiogenesis and lymphangiogenesis in oral carcinoma. *Oral Oncol.* **45**, 883–6 (2009).

ANEXA 1 - ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ DESFĂȘURATĂ PE PARCURSUL STUDIILOR DOCTORALE

1. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1.1. ARTICOLE ISI CU FACTOR DE IMPACT PUBLICATE ÎN CALITATE DE AUTOR PRINCIPAL

1. **Andreea Călinescu**, Gabriela Turcu, Roxana I. Nedelcu, Alice Brînzea, Anastasia Hodorocea, Mihaela Antohe, Carmen Diaconu, Coralia Bleotu, Nicolae D. Pirici, Lucia B. Jilăveanu, Daniela A. Ion, Ioana A. Bădărău. On the dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule1 (CEACAM1) in human malignancies. Journal of Immunology Research, Volume 2018, Article ID 7169081, 8 pages. IF 3.404

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6204181/>

2. Anastasia Hodorocea, **Andreea Călinescu**, Mihaela Antohe, Mihaela Balaban, Roxana Ioana Nedelcu, Gabriela Turcu, Daniela Adriana Ion, Ioana Anca Badarau, Catalin Mihai Popescu, Raluca Popescu, Cristiana Popp, Mirela Cioplea, Luciana Nichita, Ionela Hulea and Alice Brinzea. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. Analytical Cellular Pathology Volume 2019, Article ID 3851576, 11 pages, IF 1.788

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31934531/>

1.2. ARTICOLE BDI PUBLICATE ÎN CALITATE DE AUTOR PRINCIPAL

1. **Andreea Călinescu**, C. Scheau, Sabina Zurac, Roxana Nedelcu, Alice Brînzea, Gabriela Turcu, Anastasia Coman, Mihaela Antohe, Mihaela Balaban, Ionela Hulea, R. Andrei, Daniela Ion, Anca Bădărău. Analysis of E-cadherin expression in a group of primary cutaneous squamous cell carcinomas. Romanian Journal of Clinical Research. 2019. Vol 2, No 2.

<http://www.rjronline.com/index.php/rjcr/article/view/33>

1.3. ARTICOLE ISI CU FACTOR DE IMPACT PUBLICATE ÎN CALITATE DE CO-AUTOR

1. Antohe M, RI Nedelcu, L Nichita, C Popp, M Cioplea, A Branzea, A Hodorocea, **A Călinescu**, DA Ion, C Diaconu, C Bleotu, ND Pirici, SA Zurac, G Turcu. Tumor infiltrating lymphocytes - the regulator of melanoma evolution. Oncology Letters, Volume 17, 2019, 4155:4161; IF 1.871

<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.9940>

2. R Nedelcu, M Balaban, G Turcu, A Brinzea, D Ion, M Antohe, A Hodorocea, **A Călinescu**, C Popp, M Cioplea, L Nichita, S Popescu, C Diaconu, C Bleotu, D Pirici, R Popescu, C Popescu, S Zurac. Efficacy of methotrexate as anti-inflammatory and anti-

proliferative drug in dermatology. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019 Aug; 18(2): 905–910. IF 1.785

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6639959/>

3. A Brinzea, RI Nedelcu, G Turcu, M Antohe, A Hodorogea, A Calinescu, DA Ion, D Pirici, R Popescu, CM Popescu, C Popp, M Cioplea, SA Zurac. Matrixmetalloproteinases expression in lentigo maligna/lentigo maligna melanoma - a review of the literature and personal experience. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(4):1091-1095.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32239083/>

2. BURSE / PROIECTE CÂȘTIGATE

1. „Michael Hornstein Memorial Scholarship”. A 28-a ediție a congresului Academiei Europene de Dermatologie și Venerologie (EADV), Madrid, 2019

2. Director de proiect câștigat prin competiție - PROIECT DE MOBILITATE PENTRU CERCETĂTORI. PN-III-P1-1.1-MC-2018-1020 al Unității Executive pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI), București, 2018

3. Director de proiect câștigat prin competiție - PROIECT DE MOBILITATE PENTRU CERCETĂTORI. PN-III-P1-1.1-MC-2017-0044 al Unității Executive pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI), București, 2017

3. PREZENTĂRI NAȚIONALE CONFERINȚE

1. RI Nedelcu, A Brinzea, G Turcu, M Antohe, M Balaban, A Hodorogea, **A Călinescu**, E Balasescu, R Popescu, C Popescu, DA Ion. Workshop - De ce dermatoscopia?. ZEM-Zilele Educatiei Medicale, Bucuresti, 16 martie-1 aprilie, 2018

2. A Brinzea, RI Nedelcu, G Turcu, M Antohe, M Balaban, A Hodorogea, **A Călinescu**, E Balasescu, DA Ion, R Popescu, C Popescu. Workshop: Veștile din spatele dermatoscopului. ZEM-Zilele Educatiei Medicale, Bucuresti, 16 martie-1 aprilie, 2018