

Universitatea Titu Maiorescu
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

*Studiul unor indicatori imunologici și ai inflamației în
carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială –
realizarea unui nou algoritm de predicție*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. HABIL. CRISTIANA TĂNASE

Student-doctorand:
LUCA căs.CĂRUNTU ANA

CUPRINS

		Pagina
	Introducere	
	Lista de abrevieri	
I	Partea generală. Stadiul actual al cunoașterii	
1	Procesul de carcinogeneză: genetica, reacția inflamatorie sistemică, stresul oxidativ, microbiom	
2	Imunitatea și cancerul: celulele imune, micromediul tumoral	
3	Carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială (HNSCC): epidemiologie, etiopatogenie, aspecte clinice, diagnostic, prognostic, tratament	
II	Partea specială. Contribuții personale	
1	Ipoteza de lucru și obiectivele generale	
2	Analiza complexă a parametrilor clinico-biologici la pacienții cu carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială - realizarea unui nou algoritm de predicție	
	Scopul cercetării, ipoteza	
	Material și metodă	
	Analiza statistică	
	Rezultatele studiului	
	Discuții	
3	Studiul subtipurilor de celule imune circulante periferice la pacienții cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială	
	Scopul cercetării, ipoteza	

INTRODUCERE

Pe parcursul existenței sale umanitatea a dus o permanentă luptă pentru supraviețuire și evoluție. De-a lungul istoriei au existat diferite provocări pe care specia noastră a fost pusă în situația de a le învinge. Calamități naturale, conflicte armate, epidemii, sunt evenimente care au decimat milioane de oameni. Cu toate acestea, de fiecare dată omul s-a ridicat, a devenit mai puternic și a mers mai departe. Situația nu s-a schimbat nici în zilele noastre. În continuare ducem aceeași luptă, care se manifestă pe diferite planuri. Bătăliile sunt din ce în ce mai complexe, cu subtilități morale și etice. Oare unde ne vom găsi peste 50,100,1000 de ani?

Lupta contra cancerului este una dintre bătăliile majore pe care o duce omul în zilele noastre. Deși cunoscut de foarte multă vreme, primele documentări fiind din vremea Egiptului antic (*History of cancer, 2009*), abia în ultimul secol am ajuns cu adevărat să conștientizăm pericolul constituit de această boală cruntă și ne-am mobilizat în căutarea de soluții pentru a ieși învingători și din această luptă. Dar, deși eforturile sunt susținute, din ce în ce mai bine structurate, realitatea arată că suntem încă departe de a ne considera învingători. Datele statistice globale arată că în ultimele decenii, nu au apărut soluții care să modifice major supraviețuirea pacienților afectați de cancer, iar mortalitatea asociată acestei patologii s-a redus cu doar 15% în ultimii 30 de ani, în ciuda resurselor majore umane și financiare implicate în acest proces (*Cancer, 2015*). În același timp, analiza efectuată pe diverse tipuri de cancer raportează rezultate încurajatoare, cu progrese uriașe în managementului cancerului mamar, a melanomului, cancerului colorectal (*WHO website, 2018*). Aceste date arată că eforturile depuse nu sunt zadarnice. Dezvoltarea tehnologică și descoperirile științifice constituie o bază solidă pentru momentul loviturii de grație, una cu magnitudine similară descoperirii “penicilinei”, când va fi identificată terapia care va învinge cancerul.

Subiectul abordat în lucrarea de față este inclus în tematica mai largă a neoplaziilor sferei oro-maxilo-faciale cu mecanismele fiziopatologice și importanțele sale implicații terapeutice și de prognostic. Acesta este unul dintre tipurile de cancer în care progresele medicale nu au mers mână în mână cu supraviețuirea pacienților. Datele statistice arată că în ultimii 50 ani atât incidența cât și mortalitatea prin carcinom spinocelular oro-maxilo-facial au crescut în cifre absolute, pe fondul creșterii speranței de

viață și a populației globale (*WHO website, 2018*). Deși s-au făcut progrese în prevenție și opțiuni terapeutice, care s-au corelat și cu o îmbunătățire a supraviețuirii, rata de mortalitate la 5 ani este încă ridicată. Îmbunătățirile majore în controlul bolii și supraviețuire sau corelat cu stadializarea, deci diagnosticul precoce al bolii, iar date recente scot în evidență și imunitatea ca element important în evoluția acestei neoplazii.

În *Partea Generală* a acesei lucrări am efectuat o documentare extinsă asupra problematicei carcinogenezei și a implicării imunității în debutul și progresia neoplaziilor. Procesul de tumorigeneză este analizat în toate etapele de evoluție, de la modificările intracelulare până la progresia spre forme avansate de boală, o atenție sporită fiind acordată corelațiilor cu apărarea imună antitumorală și răspunsul inflamator sistemic în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială. La acești pacienți, stadializarea clinică rămâne criteriul principal prognostic, de unde reiese și importanța unui diagnostic precoce. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* este o metodă de investigare imagistică neinvazivă care și-a demonstrat valoarea în diagnosticul afecțiunilor cutanate precum carcinomul bazocelular sau psoriazisul (Lupu et al., 2019). Această tehnică este propusă pentru evaluarea leziunilor labiale încă din etapa de leziuni precanceroase, de tipul cheilitei actinice, datele din literatură oferind rezultate promițătoare în ceea ce privește utilizarea tehnicii în diagnosticul precoce al carcinomului spinocelular labial (Lupu, Caruntu et al., 2018).

Pe lângă diagnosticul precoce, identificarea unor elemente cu caracter prognostic, independente de stadializarea clinică, încă din momentul diagnosticului ar putea influența abordarea terapeutică a pacientului, cu instituirea unor măsuri energice de tratament în cazurile cu risc crescut de evoluție nefastă. Biomarkerii de prognostic, reprezentați de elemente circulante sau de la nivel tumoral, sunt intens studiați în toate neoplaziile, deci și în carcinomul spinocelular oro-maxilo-facial, iar raportările din ultimii ani propun o paletă largă de molecule cu potențial prognostic, de evaluare a rezistenței la tratament și de monitorizare în această boală (Chen et al., 2019; Laytragoon Lewin et al., 2017; Näsman et al., 2017; Spector et al., 2019).

Astfel, în *Partea Specială* a lucrării, am inclus rezultatele obținute în urma cercetărilor desfășurate pentru investigarea potențialului de predicție al parametrilor clinico-biologici imunologici și ai inflamației, determinați în mod uzual în evaluarea

pacienților cu neoplazii în această sferă, analizând și puterea prognostică cumulativă a acestora. De asemenea, mi-am propus să evaluez rolul tehnicilor moderne de investigare imagistică în diagnosticul precoce și monitorizarea pacienților cu carcinom spinocelular cu localizare labială, prin metoda microscopiei confocale de reflectanță *in vivo*, cu definirea unor criterii de diagnostic imagistic pentru carcinomul spinocelular labial.

Partea specială. Contribuții personale

Ipoteza de lucru de la care am plecat este ca în procesul de carcinogeneză și progresie tumorală există interacțiuni complexe între celulele tumorale și efectorii sistemului imun, acestea desfășurându-se pe fondul unui proces inflamator sistemic. Plecând de la aceste premise, am inițiat o analiză complexă a parametrilor clinico-biologici, corelați cu activitatea imună și inflamația sistemică, care sunt determinați în evaluarea curentă a pacienților cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială, cu scopul de a identifica noi elemente cu potențial prognostic, disponibile precoce, înainte de inițierea oricărei terapii. Urmărind aceleași valențe predictive, am evaluat subpopulațiile limfocitare circulante la pacienții cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial în comparație cu un lot control. Nu în ultimul rând, urmărind același obiectiv privind supraviețuirea pacienților cu carcinom spinocelular din sfera oro-maxilo-facială, care este strâns corelată cu stadializarea bolii, am evaluat potențialul de diagnostic și de diferențiere a unei noi metode de investigare imagistică neinvazivă, microscopia confocală de reflectanță *in vivo*, în carcinomul spinocelular labial și leziunile premaligne labiale.

Obiectivele urmărite prin această cercetare doctorală sunt: identificarea factorilor biologici imunologici și ai inflamației, care poartă un caracter prognostic în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială, elaborarea unui algoritm de predicție bazat pe parametri definiți anterior, care să poată fi implementat în activitatea clinică curentă la acești pacienți, caracterizarea pacienților cu carcinom spinocelular afectând sfera oro-maxilo-facială din punct de vedere al populațiilor imune circulante și definirea unor criterii de diagnostic precoce prin tehnica microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* la pacienții cu carcinom spinocelular labial.

Studiul 1: Analiza complexă a parametrilor clinico-biologici la pacienții cu carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială - realizarea unui nou algoritm de predicție

Scopul cercetării, ipoteza

Este unanim acceptat faptul că răspunsul imun și reacția inflamatorie sistemică joacă un rol major în evoluția cancerului, iar biomarkerii imuni sunt intens studiați atât pentru potențialul predictiv cât și pentru dezvoltarea și creșterea eficienței terapiilor țintă imune, care funcționează pe principiul potențării răspunsului imun antitumoral. În același timp, biomarkerul de prognostic ideal ar trebui să fie facil de prelevat și analizat, implicând costuri reduse, cu sensibilitate și specificitate înalte, reproductibil la intervale variate de timp. Plecând de la aceste premise, mi-am propus să investighez bagajul prognostic înmagazinat de o serie de parametri circulanți determinați în mod uzual în evaluarea preoperatorie a pacienților cu diagnostic de carcinom spinocelular oro-maxilo-facial în stadii operabile. De asemenea, mi-am propus să evaluez potențialul cumulativ de predicție al acestora, prin construirea unui algoritm prognostic.

Material și metodă

În cadrul acestei etape a cercetării doctorale am realizat un studiu observațional retrospectiv, desfășurat pe durata a 4 ani, în care au fost incluși pacienții cu patologie oncologică de tip carcinom spinocelular afectând sfera oro-maxilo-facială tratați în serviciul de Chirurgie Orală și Maxilofacială din cadrul Spitalului Militar de Urgență Universitar București.

Studiul s-a desfășurat pe un număr de 161 de pacienți. Criteriile de includere au fost: pacienți cu diagnostic confirmat histopatologic de carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială, în stadii operabile (T1-T4a), la care au fost disponibile datele de evoluție. Au fost excluși subiecții care aveau forme inoperabile de cancer (stadiul T4b), cei care aveau și alte neoplazii concomitente sau în antecedente, cei cu afecțiuni asociate severe sau decompensate, precum și subiecții cu afecțiuni inflamatorii sau autoimune.

În cadrul pregătirilor preoperatorii, a fost evaluată starea generală a pacienților, constând în prelevarea de probe biologice și investigații paraclinice. Rezultatele

hemoleucogramei, a markerilor inflamatori în circulația periferică și a celor biochimici au fost analizate, urmărind identificarea de elemente circulante cu proprietăți prognostice la pacienții cu carcinom spinocelular interesând sfera oro-maxilo-facială.

Prognosticul a fost corelat cu decesul cauzat de boală astfel: evoluția favorabilă a fost definită ca supraviețuire totală (OS) și a inclus subiecții în viață la ultima vizită de dispensarizare/contact telefonic, precum și subiecții decedați din altă cauză decât boala. Evoluția nefavorabilă (DRD) a fost definită ca decesul pacientului prin progresia bolii. Analiza parametrilor de interes s-a efectuat inițial pe lotul total de pacienți și apoi în funcție de extensia loco-regională a bolii, prin împărțirea lotului în pacienți cu boală incipientă (stadializare TNM I și II) și boală avansată local/regional (stadializarea TNM III și IVA).

Analiza efectuată a permis selecția fibrinogenului seric și a raportului celular plachete-limfocite, PLR, cu corelații semnificative prognostice în grupul de studiu. Prin analiza curbelor ROC pentru cei doi parametri am stabilit valorile prag optime și am construit un algoritm, denumit algoritmul fibrinogen-PLR (AFP), format din patru clase, în funcție de valorile preoperatorii ale fibrinogenului seric și PLR. Utilizând metoda Kaplan-Meier am analizat curbele de supraviețuire pentru pacienții incluși în cele patru clase AFP. Ulterior am efectuat aceeași analiză în grupul de pacienți cu boală avansată loco-regional. Valoarea cumulativă prognostică a fost certificată prin analiza curbei ROC pentru ambele criterii ale algoritmului evaluate simultan.

Rezultate și Discuții

Rezultatele obținute în urma analizei lotului de studiu sunt în concordanță cu datele raportate în literatura de specialitate, bărbații fiind mult mai frecvent afectați față de femei, cu un raport bărbați: femei de 4:1, iar media de vârstă a subiecților fiind de 64 ani. Formele avansate de boală au fost mai frecvent întâlnite la bărbați ($p=0.0437$), fapt care a asociat și o rată mai mare de mortalitate la acestea, fără a atinge însă pragul semnificației statistice ($p=0.0562$). Expunerea la factori de risc cunoscuți, fumatul și consumul cronic de alcool, s-a confirmat la un număr mare de pacienți și în lotul nostru de studiu, aceștia demonstrând și corelații intens semnificative cu prognosticul pacienților. Astfel, pacienții fumători și la care s-a confirmat consumul abuziv de alcool au avut o

rată mult mai mare de evoluție nefavorabilă, cu o incidență mare a deceselor cauzate de boală, în comparație cu cei care au infirmat practicarea acestor obiceiuri vicioase ($p=0.0009$, respectiv $p=0.0003$).

Extensia loco-regională a bolii este criteriul major de prognostic, dar în ciuda eforturilor depuse pentru un diagnostic precoce, în continuare un număr important de pacienți se prezintă cu boală avansată loco-regional încă de la prima consultație. În lotul analizat, aproape o jumătate dintre pacienți aveau boală avansată la momentul diagnosticului (48%), dimensiunile mari tumorale și stadiile avansate TNM demonstrând corelații intense cu evoluția nefavorabilă ($p<0.0001$). Localizarea orală este mult mai frecvent diagnosticată în stadii avansate și se corelează cu o rată mai mare de decese cauzate de boală în comparație cu localizările labială și cutanată ($p=0.0294$).

În analiza efectuată am constatat că deși incidența bolii a fost relativ omogen distribuită între mediul urban și rural (53% și 47%), fără variații semnificative ale stadializării bolii, pacienții proveniți din mediul rural au asociat o rată mai mare a deceselor cauzate de boală (0.0171). Accesul limitat la servicii medicale în mediul rural în coroborare cu un nivel scăzut al veniturilor la această categorie de oameni, ar putea explica această situație.

În analiza lotului de studiu am indentificat o corelație intensă între radicalitatea exciziei chirurgicale, cu asigurarea de margini libere tumorale, și stadializarea bolii ($p=0.0001$).

Rezultatele studiului de față au identificat o serie de parametri biologici determinați în mod curent în evaluarea oricărui pacient oncologic, cu potențial de stratificare a pacienților în funcție de riscul prognostic, oferind argumente suplimentare față de stadializarea TNM de orientare a conduitei terapeutice. Analiza parametrilor serologici inflamatori și imuni a identificat diferențe semnificative statistic ale valorilor fibrinogenului seric între subiecții care au avut o evoluție favorabilă și subiecții la care a survenit decesul din cauza bolii, atât în lotul total de pacienți ($p=0.0001$) cât și în analiza lotului de pacienți cu boală avansată (0.0061). Analizând valorile fibrinogenului seric în stadiile incipiente, am constatat că nivelul acestuia crește odată cu extensia loco-regională a bolii ($p=0.0294$).

VSH-ul, un alt marker al inflamației determinat de rutină în evaluarea oricărui pacient, a demonstrat corelații intens semnificative cu stadializarea bolii, valori mai mari fiind identificate la subiecții cu boală avansată loco-regional ($p=0.0095$). Deși la analiza globală acest parametru s-a corelat semnificativ cu evoluția nefavorabilă ($p=0.0342$), această corelație nu s-a menținut la analiza pacienților cu forme avansate de boală ($p=0.1738$).

Analiza elementelor celulare sangvine a evidențiat diferențe semnificative statistic pentru mai multe populații celulare. Trombocitele s-au corelat semnificativ cu supraviețuirea pacienților atât în analiza globală cât și în cea focalizată pe boala avansată loco-regional. Deși semnificative statistic, variațiile valorice au fost discrete și s-au încadrat în general în intervalul de referință pentru acest parametru. Un număr crescut al trombocitelor circulante s-a corelat cu evoluția nefavorabilă în lotul global de pacienți ($p=0.0089$) și în lotul cu boală avansată ($p=0.0402$). Aceleași modificări au fost observate și în corelație cu stadiile avansate de boală, fără a atinge însă nivelul semnificației statistice (0.0509).

Trombocitele au fost evaluate independent, dar și raport cu numărul de limfocite plasmatic, parametru cunoscut sub denumirea de PLR. În studiul de față, PLR a demonstrat valențe prognostice superioare față de număratoarea trombocitelor, valorile mari fiind corelate cu evoluția nefavorabilă atât în lotul global de pacienți ($p=0.0037$) cât și la analiza lotului de pacienți cu boală avansată loco-regional ($p=0.0058$). Creșterea valorii PLR s-a corelat și cu progresia de la forma incipientă la cea avansată de boală ($p=0.018$). Analiza acestui raport este de mare interes deoarece înglobează informația furnizată de doi factori celulari independenți, plachete și limfocite, fiecare cu proprietăți prognostice individuale în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială (Kuss et al., 2005).

Reprezentății seriei albe analizați în studiul de față au demonstrat diferențe semnificative statistic ale raportului de limfocite din totalul de leucocite în corelație cu boala avansată loco-regional și cu supraviețuirea la lotul global de pacienți. Astfel, am detectat o valoare procentuală scăzută a limfocitelor circulante la pacienții cu boală avansată loco-regional ($p=0.0068$), precum și la pacienții care au avut evoluție nefavorabilă ($p=0.0138$). Corelația cu prognosticul nu s-a menținut și la analiza efectuată

pe grupul de pacienți cu boală avansată loco-regional. De asemenea, am constatat că valoarea absolută de limfocite circulante nu a demonstrat corelații semnificative nici cu stadiul bolii, nici cu supraviețuirea.

Neutrofilele pe de altă parte au demonstrat un trend invers față de limfocite, valori crescute ale acestora în valoare absolută și/sau procentuală fiind corelate cu progresia spre forma avansată de boală ($p=0.0213$ și $p=0.0185$), dar și cu evoluția nefavorabilă în analiza lotului global de pacienți ($p=0.04$). Ca și în cazul limfocitelor, semnificația statistică prognostică nu s-a menținut atunci când analiza a vizat grupul de pacienți cu boală avansată loco-regional.

Analiza corelată a celor doi reprezentanți din seria albă, limfocite și neutrofile, sub forma raportului neutrofile-limfocite (NLR) s-a dovedit a fi de asemenea cu potență prognostică în lotul nostru de studiu. Valorile mari NLR, traduse printr-un număr crescut de neutrofile și/sau în număr scăzut de limfocite, au fost mai frecvent întâlnite la pacienții cu evoluția nefavorabilă în lotul total de pacienți (0.0206). Corelația nu s-a menținut însă la analiza efectuată pe grupul de pacienți cu boală avansată. În schimb, corelațiile au fost semnificative în relație cu stadiul bolii, valorile mari NLR fiind mai frecvent întâlnite la pacienții cu boală avansată loco-regional ($p=0.0163$).

Analiza lotului total de pacienți în funcție de stadializarea bolii a pus în evidență și o reducere importantă a nivelului ureei serice la pacienții cu boală avansată loco-regional ($p=0.0025$). Nivelul seric al ureei nu a avut corelații cu caracter prognostic, indiferent de stadializarea bolii.

Analiza prezentată mai sus a permis identificarea a doi parametri în circulația periferică care s-au corelat intens semnificativ cu prognosticul atât în lotul total de pacienți cât și în subgrupul de pacienți cu boală avansată loco-regional. Componenta inflamatorie sistemică, exprimată prin fibrinogenul seric, și componenta imună antitumorală, exprimată prin raportul plachete-limfocite (PLR), au demonstrat puternice valențe prognostice. Analiza curbei ROC pentru fibrinogenul seric în lotul nostru de studiu a calculat o arie de sub curbă egală cu 0.7203 ($p=0.0001$). Analiza similară efectuată prin trasarea curbei ROC pentru valorile PLR detectate în lotul total de pacienți, a calculat o arie sub curbă de 0.6660 ($p=0.004$). Calculul curbelor de supraviețuire prin metoda Kaplan-Meier, aplicând valorile prag menționate mai sus, au arătat diferențe

semnificative statistic pentru ambii parametri. Astfel, la subiecții cu valori ale fibrinogenului seric egale sau mai mari decât 500 mg/dL incidența decesului cauzat de progresia bolii a fost semnificativ mai mare ($p=0.0017$). Rezultate similare am obținut și pentru PLR. Grupul de pacienți, care la momentul diagnosticului aveau valori ale PLR mai mari sau egale cu 125 s-au confruntat cu o incidență mai mare a deceselor cauzate de boală ($p=0.0052$). Aceeași semnificație statistică s-a menținut și în analiza curbelor de supraviețuire în lotul de pacienți cu boală avansată loco-regional. Depășirea valorii prag pentru fibrinogenul seric la pacienții cu boală avansată s-a corelat cu evoluția nefavorabilă ($p=0.0099$). De asemenea, subiecții cu boală avansată, la care valorile PLR determinate preoperator au depășit nivelul prag definit anterior, s-au confruntat cu o rată mai mare a deceselor cauzate de boală ($p=0.0049$).

Pe baza rezultatelor raportate mai sus, am decis să evaluez puterea prognostică a celor doi parametri circulanți, fibrinogen și PLR, în cadrul unui scor bazat pe cuantificarea componentelor inflamatorice și imună periferică, scor pe care l-am denumit Algoritmul Fibrinogen-PLR (AFP). Pacienții încadrați în cele patru clase ale scorului în funcție de nivelul prag pentru fibrinogen și PLR – AFP1.1, AFP1.0, AFP0.1, AFP0.0, au demonstrat diferențe semnificative de supraviețuire prin analiza Kaplan-Meier atât în lotul total (0.002) cât și în boala avansată loco-regional (0.01). Analiza efectuată a permis încadrarea pacienților din lotul nostru de studiu în două clase de risc în funcție de nivelul preoperator al fibrinogenului și PLR. Pacienții cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială, cu fibrinogen seric ≥ 500 mg/dL și PLR ≥ 125 – clasa AFP1.1- au asociat un risc semnificativ mai mare de evoluție nefavorabilă, indiferent de stadializarea bolii. În lotul global, analiza comparativă față de restul claselor a fost confirmată ($p < 0.0001$). Această analiză a fost confirmată și în lotul de pacienți cu boală avansată (0.0016). Celelalte trei clase –AFP1.0, AFP0.1 și AFP0.0- nu au avut diferențe semnificative statistic între ele în urma analizei curbelor de supraviețuire. Aceste rezultate sugerează potențialul prognostic cumulativ al celor doi parametri circulanți în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială. Pacienții care au valori crescute peste nivelul prag pentru ambele criterii sunt la risc semnificativ mai mare de evoluție nefavorabilă față de pacienții care au valorile sub nivelul prag pentru fibrinogen (AFP0.1), pentru PLR (AFP1.0) sau pentru ambele (AFP0.0). Și mai important este că diferențele se mențin

atunci când analizăm pacienții cu boală avansată loco-regional (stadiile III și IVA). Acest fapt sugerează potențialul independent de prognostic al algoritmului AFP față de stadializarea TNM. O analiză efectuată pe lotul de pacienți cu boală incipientă ar fi putut aduce argumente suplimentare care să susțină această afirmație. Nu am putut realiza o astfel de analiză pentru lotul de pacienți cu boală incipientă din cauza numărului mic de cazuri la care a survenit decesul din cauza bolii, 5 cazuri, ceea ce pe de o parte este în concordanță cu rolul major prognostic al stadializării TNM în carcinomul spinocelular oro-maxilo-facial, dar a făcut imposibilă încadrarea unui număr minim de pacienți în fiecare clasă AFP pentru o analiză validă. Implementarea multicentrică a unei astfel de analize ar putea contribui major la validare sau dimpotrivă infirmarea potențialului prognostic al AFP.

Potențialul cumulativ prognostic al celor doi parametri, fibrinogen și PLR, a fost susținut suplimentar și în urma analizei curbei ROC care a însumat valorile procentuale față de nivelul prag. Creșterea semnificativă a ariei de sub curbă în analiza cumulativ, $AUC=0.739$ ($p<0.0001$) față de 0.7203 pentru fibrinogen și 0.6660 pentru PLR, confirmă efect cumulativ prognostic al celor doi parametri.

Disponibilitate unei evaluări simple, ieftine și rapide a riscului prognostic pe baza unor elemente circulante determinate de rutină în managementul pacientului oncologic, este susținută prin rezultatele obținute în urma studiului de față, și structurate sub forma algoritmului AFP. Un beneficiu major sugerat prin rezultatele raportate, ar fi caracterul independent al acestui biomarker prognostic față de stadializarea TNM. Astfel, chiar și în formele incipiente de boală, am putea identifica un grup de pacienți cu risc crescut de evoluție nefavorabilă. Acest lucru ar permite adaptarea atitudinii terapeutice încă de la momentul diagnosticului pentru combaterea unei forme cu agresivitate sporită, chiar și în condițiile stadializării incipiente. În cazul pacienților cu boală avansată, atitudinea terapeutică este energetică de la început, chiar și cu riscul unor reacții adverse importante, iar o includere în clase de risc suplimentar nu ar modifica probabil abordarea terapeutică a pacientului. Cu toate acestea, includerea unui pacient cu boală avansată loco-regional în clasa de risc crescut AFP (AFP1.1) ar putea permite o optimizare a tuturor etapelor de management al pacientului oncologic, cu ședințe mai frecvente de dispensarizare, cu interval mai scurte între scanările imagistice, astfel încât virajul către o evoluție

nefavorabilă să fie depistat precoce și să permită implementarea de măsuri terapeutice adecvate. Totodată, pacienții cu boală avansată, încadrați în clasa cu risc crescut de evoluție nefavorabilă, ar putea fi candidați pentru terapiile anticanceroase de rezervă înainte de apariția recidivelor sau a metastazelor. Din punct de vedere chirurgical, încadrarea în clasa de risc crescut a unui pacient cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială, ar putea orienta medicul către o intervenție mai extinsă, pentru a asigura radicalitatea exciziei, iar raportarea unor margini de excizie reduse sau chiar pozitive, ar orienta medicul către reintervenție și nu către o soluție adjuvantă de controlul local al bolii. Un pacient la risc ar putea beneficia de măsuri suplimentare de asigurare a radicalității tratamentului chirurgical, prin examene extemporanee intraoperatorii, examene care nu sunt efectuate de rutină în prezent în țara noastră.

Rezultatele raportate susțin potențialul prognostic al algoritmului AFP, iar simplitatea aplicării acestuia este încurajatoare pentru a putea fi introdus în practica curentă. Studii suplimentare pe grupuri mai de pacienți cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial, eventual multicentrice, ar putea valida rezultatele raportate mai sus. Iar introducerea algoritmului în sistemul informatic al spitalelor ar putea oferi în rezultatele raportate pentru fiecare dintre pacienți clasa de risc, scutind astfel medicul de efectuarea calculelor necesare. Având în vedere că rolul prognostic al fibrinogenului și PLR este susținut și în alte tipuri de neoplazii, o evaluare a potențialului prognostic AFP ar putea demonstra valențe similare și în alte forme de cancer.

Studiul 2. Investigarea subtipurilor de celule imune circulante periferice la pacienții cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială

Scopul cercetării, ipoteza

În patogenia carcinomului spinocelular oro-maxilo-facial procesele imunomodulatorii joacă un rol important, existând numeroase corelații cu modificări ale distribuției și funcționalității celulelor imune și în special ale limfocitelor. Analiza detaliată a impactului diferitelor tipuri limfocitare ar putea contribui la o mai bună înțelegere a proceselor imune și a corelațiilor cu procesul de carcinogeneză.

În această etapă a studiului doctoral mi-am propus investigarea populațiilor limfocitare și a distribuției acestora în circulația periferică la pacienți diagnosticați cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială comparativ cu nivelurile măsurate la subiecți control având caracteristici demografice similare. De asemenea, mi-am propus investigarea în dinamică a evoluției nivelului celulelor imune circulante la pacienți înainte de tratament și după finalizarea acestuia, pentru evaluarea unui posibil rol prognostic al acestor determinări.

Material și metodă

În cadrul acestui studiu observațional, prospectiv, au fost incluși 13 pacienți cu forme operabile de carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială și un lot control format dintr-un număr de 20 subiecți fără patologie neoplazică, infecțioasă sau inflamatorie, cu caracteristici demografice comparabile cu lotul test.

Determinarea populațiilor imune circulante a fost realizată preoperator și la trei luni de la încheierea tratamentului. Statusul imun celular a fost evaluat prin imunofenotipare limfocitară – profil de bază și a presupus analiza populațiilor celulare din sângele periferic prin citometrie în flux pe baza expresiei markerilor de suprafață după cum urmează: limfocite T totale ($CD3^+$) cu subpopulațiile limfocite T helper cu fenotip $CD3^+CD4^+$ și limfocite T supresoare/citotoxice cu fenotip $CD3^+CD8^+$; limfocite B totale cu fenotip $CD3^-CD19^+$; celule NK cu fenotip $CD3^-CD16^+CD56^+$.

Pentru investigarea dinamicii evoluției nivelului populațiilor limfocitare circulante am efectuat o evaluare comparativă a datelor obținute înainte de tratament și după finalizarea acestuia. De asemenea, am efectuat o evaluare a diferențelor existente între datelor obținute înainte și după tratament la pacienții cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială și subiecții din lotul control.

Rezultate. Discuții

În ceea ce privește investigarea comparativă între loturi a populațiilor limfocitare circulante, datele obținute atât pre- cât și postoperator au arătat un procent similar al limfocitelor T totale ($CD3^+$) la pacienții cu carcinom spinocelular și subiecții control. Pe de altă parte, datele rezultate preoperator privind subpopulațiile limfocitare T au arătat o

proporție scăzută a limfocitelor T helper (CD4+), un procent semnificativ mai ridicat al limfocitelor T citotoxice/supresoare (CD8+) și un raport limfocite T CD4+/ limfocite T CD8+ cu o valoare mult redusă față de subiecții control. Aceste diferențe s-au menținut semnificative și la trei luni după încheierea terapiei.

De asemenea, proporția limfocitelor B (CD19+) a fost semnificativ redusă în lotul pacienților cu carcinom spinocelular atât pre- cât și postoperator.

Pe de altă parte, cercetarea privind proporția celulelor NK (CD16+) a arătat un nivel preoperator marcat crescut, însă după finalizarea tratamentului nu a mai putut fi pusă în evidență o diferență semnificativă față de subiecții control.

Analiza noastră a cuprins și o investigație în dinamică, aceasta arătând proporții similare ale populațiilor limfocitare circulante înainte de tratament și la trei luni după finalizarea acestuia, sugerând faptul că eventualele modificări postterapeutice necesită o perioadă mai îndelungată pentru a deveni pregnante, iar afectarea mecanismelor limfocitare de răspuns antitumoral evidențiată la pacienții cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial poate persista perioade îndelungate după instituirea tratamentului.

Studiul 3. Evaluarea modificărilor microstructurale, inflamatorii și imune în carcinomul spinocelular labial inferior

Scopul cercetării, ipoteza

Carcinomul spinocelular labial se dezvoltă pe fondul unor modificări microstructurale instalate progresiv, care în evoluție devin leziuni de cheilită actinică, leziune precanceroasă frecvent întâlnită în populația generală (De Souza Lucena *et al.*, 2012). Există o mare variabilitate de aspecte clinice în leziunile premaligne și maligne ale buzei, fapt care ridică probleme majore de diagnostic diferențial (R.A.M.A.R. *et al.*, 2012).

În cadrul acestei etape a cercetării doctorale mi-am propus să evaluez în ce măsură microscopia confocală de reflectanță *in vivo*, poate fi utilizată în diagnosticul leziunilor premaligne și maligne de mucoasă labială. De asemenea, mi-am propus să analizez caracteristicile microstructurale, inflamatorii și imune care diferențiază

carcinomul spinocelular al buzei și cheilita actinică, utilizând această tehnică inovativă de investigare imagistică.

Material și metodă

Într-o primă etapă a studiului nostru, pentru identificarea criteriilor de diagnostic imagistic *in vivo* prin microscopie confocală în cheilita actinică și carcinomul spinocelular labial am evaluat preoperator, cu ajutorul microscopului confocal Vivascope 1500, trei pacienți la care, în urma examenului clinic, am stabilit diagnosticul prezumtiv de cheilită actinică într-un caz și carcinom spinocelular labial inferior în faza de debut pentru alți doi pacienți. Ulterior, pacienții au efectuat intervenția chirurgicală de excizie a leziunilor iar piesele de excizie au fost examinate histologic, utilizând metoda standard de colorație cu hematoxilin-eozină.

În a doua etapă a cercetării, pentru definirea caracteristicilor structurale, imune, vasculare și a criteriilor imagistice de diferențiere prin tehnica de microscopie confocală *in vivo* a leziunilor premaligne și maligne de buză, am inițiat un studiu în care au fost incluși 12 pacienți cu suspiciune clinică de cheilită actinică (4 cazuri) sau carcinom spinocelular labial inferior (8 cazuri).

Pentru achiziția preoperatorie de imagini de microscopie confocală a fost utilizat microscopul confocal Vivascope 1500. Ulterior, pacienții incluși în studiu au fost tratați chirurgical, efectuându-se vermilionectomia/biopsia incizională în scop diagnostic pentru cheilită actinică și excizia radicală a leziunilor suspecte de carcinom spinocelular. Piesele de excizie sau biopsie au fost examinate prin tehnici standard histopatologice, iar supoziția clinică s-a confirmat pentru fiecare dintre pacienți.

Imaginile de microscopie confocală au fost investigate, analizând următoarele criterii de diagnostic imagistic:

- la nivelul epidermului: ulcerație, hiperkeratoză/scuame, paracheratoză, aspect atipic de “fagure” în stratul granulos/spinos, dezorganizarea arhitecturii în stratul granulos/spinos, keratinocite în “țintă” în stratul granulos/ spinos, celule dendritice
- la nivelul joncțiunii dermo-epidermice: diametru vascular mărit, densitate vasculară crescută

- la nivelul dermului: elastoza solară, celule inflamatorii, celule dendritice, keratinocite atipice (cu aspect neregulat/nucleate), structuri în formă de “cuib”, perle de cheratină.

Rezultate. Discuții

Rezultatele preliminare obținute după evaluarea primilor pacienți cu leziuni labiale prin tehnica de microscopie confocală (Lupu, Caruntu, et al., 2018; Lupu, Căruntu, et al., 2018) au pus bazele analizei ulterioare pe loturile de pacienți cu cheilită actinică, respectiv carcinom spinocelular de buză, prin care ne-am propus identificarea unor criterii de diagnostic prin microscopie confocală în cele două tipuri de leziuni.

Caracteristicile asociate cu cheilită actinică al investigației prin microscopia confocală au fost aspectul atipic de “fagure” și prezența de celule în „țintă”. Leziunile de carcinom spinocelular au fost caracterizate prin prezența unei dezorganizări totale a arhitecturii epidermice și a celulelor inflamatorii care infiltrează dermul.

Analiza elementelor vasculare prin microscopie confocală a evidențiat modificări importante, vasele fiind mai mari și în număr crescut în leziunile de carcinom față de cele de cheilită actinică, ceea ce denotă o activitate metabolică intensă la nivel tumoral, traduse prin neovasularizație și aport sangvin crescut.

După datele pe care le-am avut la dispoziție până în prezent, studiul nostru este primul din literatura de specialitate care demonstrează posibilitatea utilizării tehnicii de microscopie confocală în evaluarea carcinomului spinocelular labial.

Evaluarea prin microscopie confocală a leziunilor de carcinom spinocelular labial ar putea permite definirea unor criterii de diagnostic imagistic, care să faciliteze diferențierea formelor invazive de boală față de leziunile *in situ* și cheilita actinică, prin metode simple, neinvazive, precum și dispensarizarea leziunilor suspecte. Avantajele tehnicii de microscopie confocală față de abordarea clasică sunt caracterul non-invaziv și repetitiv al metodei, ceea ce permite evaluarea în timp real, rapidă a epidermului și parțial a dermului fără a crea un disconfort semnificativ pacientului și fără a necesita alte echipamente și dispozitive de laborator.

Concluzii finale și contribuții personale

Rezultatele obținute prin analiza complexă a parametrilor clinico-biologici, studiul subtipurilor de celule imune circulante periferice și evaluarea *in vivo* a modificărilor microstructurale, inflamatorii și imune la pacienții cu carcinom spinocelular din sfera oro-maxilo-facială, ne-au permis formularea următoarelor concluzii:

- Markerii periferici ai inflamației sistemice, fibrinogenul seric și VSH-ul, se modifică la pacienții cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial odată cu progresia bolii spre stadii avansate loco-regional și în condiții de evoluție nefavorabilă
- Tulburările de apărare imună în progresia carcinomului spinocelular oro-maxilo-facial sunt sugerate de modificările constatate la nivelul populațiilor de celule albe, reducerea procentului de limfocite circulante în contrabalanță cu creșterea numărului de neutrofile fiind corelate cu un prognostic nefast la acești pacienți
- Evoluția nefavorabilă în carcinomul spinocelular oro-maxilo-facial este marcată de modificări ale numărului de trombocite circulante, care în corelație și cu modificările suferite de limfocite, sub forma raportului plachete-limfocite (PLR) pot fi utile în evaluarea prognostică a pacienților
- Includerea caracteristicilor inflamatorii și imune într-un algoritm de predicție, bazat pe valorile serice ale fibrinogenului și PLR, permit stratificarea pacienților cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial în grupe de risc prognostic
- Proprietățile prognostice ale fibrinogenului seric și PLR la pacienții cu carcinom spinocelular oral au caracter cumulativ, sporind puterea de predicție față de fiecare dintre cei doi parametri analizați individual
- Proporțiile populațiilor și subpopulațiilor limfocitare în circulația periferică a pacienților cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial, sunt profund modificate față de subiecții control, iar aceste modificări persistă o perioadă îndelungată după finalizarea tratamentului.
- Markerii ai proceselor inflamatorii, precum prezența infiltratului inflamator dermic și a vaselor sanguine cu diametru crescut fac parte din caracteristicile carcinomului spinocelular labial inferior la examinarea *in vivo* prin microscopie confocală de reflectanță alături de modificări microstructurale, precum dezorganizarea completă a arhitecturii epidermice

- Tehnicile moderne de evaluare imagistică neinvazivă, precum microscopia confocală de reflectanță pot reprezenta metode utile în diagnosticul și evaluarea prognostică a pacienților cu leziuni premaligne și maligne ale buzei

Disponibilitatea unei evaluări simple, ieftine și rapide a riscului prognostic pe baza unor elemente circulante determinate de rutină în managementul pacientului oncologic, este susținută prin rezultatele obținute în urma studiului de față, și structurat sub forma algoritmului AFP. Un beneficiu major sugerat prin rezultatele raportate, ar fi caracterul independent al acestui biomarker prognostic față de stadializarea TNM. Astfel, chiar și în formele incipiente de boală, am putea identifica un grup de pacienți cu risc crescut de evoluție nefavorabilă. Acest lucru ar permite adaptarea atitudinii terapeutice încă de la momentul diagnosticului pentru combaterea unei forme cu agresivitate sporită, chiar și în condițiile stadializării incipiente.

Totodată, pacienții cu boală avansată, încadrați în clasa cu risc crescut de evoluție nefavorabilă, ar putea fi candidați pentru terapiile anticanceroase de rezervă înainte de apariția recidivelor sau a metastazelor. Din punct de vedere chirurgical, încadrarea în clasa de risc crescut a unui pacient cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială, ar putea orienta medicul către o intervenție mai extinsă, pentru a asigura radicalitatea exciziei, iar raportarea unor margini de excizie reduse sau chiar pozitive, ar orienta medicul către reintervenție și nu către o soluție adjuvantă de controlul local al bolii. Un pacient la risc ar putea beneficia de măsuri suplimentare de asigurare a radicalității tratamentului chirurgical, prin examene extemporanee intraoperatorii, examene care nu sunt efectuate de rutină în prezent în țara noastră.

Rezultatele raportate susțin potențialul prognostic al algoritmului AFP, iar simplitatea aplicării acestuia este încurajatoare pentru a putea fi introdus în practica curentă. Studii suplimentare pe grupuri mari de pacienți cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial, eventual multicentrice, ar putea valida rezultatele raportate mai sus. Iar introducerea algoritmului în sistemul informatic al spitalelor ar putea oferi în rezultatele raportate pentru fiecare dintre pacienți clasa de risc, scutind astfel medicul de efectuarea calculelor necesare. Având în vedere că rolul prognostic al fibrinogenului și PLR este

susținut și în alte tipuri de neoplazii, o evaluare a potențialului prognostic AFP ar putea demonstra valențe similare și în alte forme de cancer.

Studierea modificărilor subseturilor limfocitare în sângele periferic al pacienților cu neoplazii în sfera orală și maxilo-facială a suscitât interesul cercetătorilor în diverse etape ale cunoașterii mecanismelor fiziopatologice implicate în acest tip de patologie iar rezultatele studiului nostru aduc un plus de informații, în contextul în care datele din literatura de specialitate oferă o imagine neconcludentă. Continuarea studiilor în această arie a cercetării va permite descifrarea unor noi mecanisme în universul complex al conexiunilor între procesele imuno-inflamatorii și carcinogeneză și va putea deschide noi posibilități de identificare a unor noi factori predictivi privind evoluția pacienților cu carcinom spinocelular oro-maxilo-facial.

Până în prezent, nu sunt raportări care să ateste utilizarea tehnicii de microscopie confocală în evaluarea carcinomului spinocelular labial, datele publicate de grupul nostru și prezentate mai sus fiind singurele informații disponibile în literatura de specialitate în această boală. Validarea rezultatelor raportate pe loturi semnificative de pacienți cu carcinom spinocelular de buză și cheilita actinică ar putea permite definirea unor protocoale de diagnostic prin microscopie confocală și includerea acestei metode de investigare imagistică în arsenalul de tehnici de evaluare a leziunilor de buză.

BIBLIOGRAFIE

- Chen, M.-F., Chen, P.-T., Kuan, F.-C., & Chen, W.-C. (2019). The Predictive Value of Pretreatment Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 26(1), 190–199. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6944-1>
- De Souza Lucena, E. E., Costa, D. C. B., Da Silveira, E. J. D., & Lima, K. C. (2012). Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01910.x>
- Kaugars, G. E., Pillion, T., Svirsky, J. A., Page, D. G., Burns, J. C., & Abbey, L. M. (1999). Actinic cheilitis a review of 152 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/S1079->

2104(99)70115-0

- Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R. L., Gooding, W., & Whiteside, T. L. (2005). Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. <https://doi.org/10.1159/000082506>
- Laytragoon Lewin, N., Lewin, F., Andersson, B. Å., Löfgren, S., & Rutqvist, L. E. (2017). The use of rapid and cost-effective blood-based biomarkers in combination with tumour TNM stage for individual head and neck cancer patient treatment selection. *Medical Oncology*, *34*(4), 3–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0912-7>
- Lupu, M., Caruntu, A., Caruntu, C., Boda, D., Moraru, L., Voiculescu, V., & Bastian, A. (2018). Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Molecular and Clinical Oncology*, *March*. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1599>
- Lupu, M., Popa, I., Voiculescu, V., Boda, D., Caruntu, C., Zurac, S., & Giurcaneanu, C. (2019). A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm8040449>
- Näsman, A., Bersani, C., Lindquist, D., Du, J., Ramqvist, T., & Dalianis, T. (2017). Human papillomavirus and potentially relevant biomarkers in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, *37*(10), 5319–5328. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11958>
- Picascia, D. D., & Robinson, J. K. (1987). Actinic cheilitis: A review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. In *Journal of the American Academy of Dermatology*. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(87\)70201-1](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(87)70201-1)
- R.A.M.A.R., V., E.M., M., M.E.A., M., & S.A., M. (2012). Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: Clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia*.
- Ritchie, M. R. and H. (2015). *Cancer*. <https://Ourworldindata.Org/Cancer>.
- Spector, M. E., Bellile, E., Amlani, L., Zarins, K., Smith, J., Brenner, J. C., Rozek, L., Nguyen, A., Thomas, D., McHugh, J. B., Taylor, J. M. G. G., & Wolf, G. T. (2019). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous

Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 1–8.
<https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.2427>

Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods.
Journal of Cancer Science & Therapy. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>

Publicații rezultate în cadrul activității doctorale

Capitole de carte - edituri internaționale

1. Georgescu SR, Tampa M, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, Caruntu A, Lupu M, Matei C, Constantin C, Neagu M. Tumour Microenvironment in Skin Carcinogenesis. In: Birbrair A. (eds) *Tumor Microenvironments in Organs*. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1226:123-142. Springer, Cham. Print ISBN: 978-3-030-36213-3; Online ISBN: 978-3-030-36214-0; doi: 10.1007/978-3-030-36214-0_10. Review. (ISI impact factor 2018: 2.126) – coautor
https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-030-36214-0_10

Articole în extenso în reviste de specialitate indexate Web of Science – ISI

1. Scheau C, Badarau IA, Mihai LG, Scheau AE, Costache DO, Constantin C, Calina D, Caruntu C, Costache RS, Caruntu A. Cannabinoids in the Pathophysiology of Skin Inflammation. *Molecules*. 2020 Feb 4;25(3). pii: E652. doi: 10.3390/molecules25030652. Review. (ISI impact factor 2018: 3.060) – **autor principal** (ultimul autor)
<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/652>
2. Mihai Lupu, Iris Maria Popa, Vlad Mihai Voiculescu, Ana Caruntu and Constantin Caruntu. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Accuracy of in Vivo Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnosis of Primary Basal Cell Carcinoma. *J. Clin. Med.* 2019, 8(9), 1462; <https://doi.org/10.3390/jcm8091462> (ISI impact factor 2018: 5.688) – coautor
<https://www.mdpi.com/2077-0383/8/9/1462>
3. Mihai Lupu, Ana Caruntu, Liliana Moraru, Vlad Mihai Voiculescu, Daniel Boda, Cristiana Tanase, Constantin Caruntu. Non-invasive imaging techniques for early diagnosis of radiation-induced squamous cell carcinoma of the lip. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(3): 949–953. (ISI impact factor 2017: 0.912) – **autor principal** (contribuție egală cu primul autor)
<https://rjme.ro/RJME/resources/files/590318949953.pdf>

4. Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, Boda D, Moraru L, Voiculescu V, Bastian A. Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Mol Clin Oncol*. 2018 May;8(5):640-646. – **autor principal** (contributii egale) <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2018.1599>
5. Solomon I, Voiculescu VM, Caruntu C, Lupu M, Popa A, Ilie MA, Albulescu R, Caruntu A, Tanase C, Constantin C, Neagu M, Boda D. Neuroendocrine Factors and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An Affair to Remember. *Dis Markers*. 2018;2018:9787831,12 pages (ISI impact factor 2016: 2.348) – coautor <https://www.hindawi.com/journals/dm/2018/9787831/>
6. Mircea Tampa, Madalina Mitran, Cristina-Iulia Mitran, Maria-Isabela Sarbu, Clara Matei, Ilinca Nicolae, Ana Caruntu, Sandra Milena Tocut, Mircea Ioan Popa, Constantin Caruntu, and Simona-Roxana Georgescu. Mediators of inflammation – a potential source of biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *J Immunol Res*. 2018 Nov 12;2018: 1061780. doi: 10.1155/2018/1061780 eCollection 2018. Review. 12 pages (ISI impact factor 2018: 3.404) <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/1061780/>
7. Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, Papagheorghe LML, Ilie MA, Voiculescu V, Boda D, Constantin C, Tanase C, Sifaki M, Drakoulis N, Mamoulakis C, Tzanakakis G, Neagu M, Spandidos DA, Izotov BN, Tsatsakis AM. Neuroendocrine factors: The missing link in non-melanoma skin cancer (Review). *Oncol Rep*. 2017 Sep;38(3):1327-1340. doi: 10.3892/or.2017.5817. Epub 2017 Jul 13. (ISI impact factor 2016: 2.662) – **autor principal** (contributie egala cu primul autor) <https://www.spandidos-publications.com/or/38/3/1327>
8. Mihai Lupu, Ana Caruntu, Daniel Boda, Constantin Caruntu. In vivo reflectance confocal microscopy - diagnostic criteria for actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. Submitted to *Journal of Clinical Medicine*. Manuscript ID: jcm-827741 (ISI impact factor 2018: 5.688) – **autor principal** (autor corespondent)

Studii în rezumat în volumele unor manifestări științifice indexate Web of Science – ISI

1. Constantin Caruntu, Daniel Boda, Ana Caruntu, Sabina Zurac, Carolina Constantin, Monica Neagu. [Role of neuro-endocrine factors in skin cancer](#). Proceedings of the Abstracts of The 24th World Congress on Advances in Oncology, and 24th International Symposium on Molecular Medicine 10-12 October, 2019, Mystras Grand Palace Resort, Sparta, Greece. International

Studii în rezumat în volumele unor manifestări științifice naționale sau internaționale (cu ISSN sau ISBN)

1. C. Caruntu, M. Lupu, Ana Caruntu, V. Voiculescu, D. Boda. **REAL TIME INVESTIGATION OF ACTINIC CHEILITIS USING CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY**. 16-th National Congress of Dermatology with international participation, Brasov 4-7 October 2017. Publicat in Dermatovenerologie ISSN 1220-3734, Vol 62, Supliment, 2017. P41, pag 22

Lucrări prezentate în cadrul altor manifestări științifice

1. Ana Caruntu, Liliana Moraru, Mihaela Surcel, Adriana Munteanu, Carolina Constantin, Cristiana Tanase, Constantin Caruntu, Monica Neagu. **Peripheral immune cell populations in patients with head and neck squamous cell carcinoma**. Poster la 31st World Congress of the International College for Maxillo-Facial-Surgery (ICMFS), Tel Aviv, Israel; October 29 - November 1, 2019.
2. Constantin Căruntu, Mihai Lupu, Mihaela Adriana Ilie, Ana Caruntu, Daniel Boda, Sabina Zurac, Carolina Constantin, Monica Neagu. **IN VIVO VIRTUAL BIOPSY OF SKIN CANCER**. Prezentare invitata la A 3-a Conferință a Asociației de Imuno-Dermatologie; A 48-a Conferință a Societății de Imunologie din România; 18-21 septembrie 2019, București.
3. Ana Caruntu, Liliana Moraru, Sabina Zurac, Cristiana Tanase, Daniel Boda, Constantin Caruntu. **In Vivo Imaging Techniques For Preoperative Investigation Of Squamous Cell Carcinoma Of The Lower Lip**. 24th Congress of the European Association for Cranio Cranio Maxillo Facial Surgery, September 18-21, 2018, Munich, Germany