

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ  
DEPARTAMENTUL II**

**SILVANA CÂNJĂU**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**OPTIMIZAREA TEHNICILOR NON-INVAZIVE PENTRU  
DIAGNOSTICUL PRECOCE AL LEZIUNILOR DIN SFERA  
ORO-FACIALĂ**

**R E Z U M A T**

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. CARMEN TODEA**

**Timișoara  
2016**

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate .....	VIII
Lista abrevierilor.....	IX
Indexul Figurilor .....	XIV
Indexul Tabelelor .....	XVIII
Mulțumiri .....	XIX
INTRODUCERE.....	XX

<b>PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>1</b>
1. Date esențiale despre patologia țesuturilor moi orale .....	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Factori de risc.....	3
1.2.1. Tutunul .....	3
1.2.2. Alcoolul.....	4
1.2.3. Virusul Papiloma Uman (HPV) și radiațiile ultraviolete (UV).....	4
1.2.4. Factori adiționali .....	4
1.2.4.1. Alte micro-organisme .....	4
1.2.4.2. Factori legați de dietă și deficiențe vitaminice/minerale .....	5
1.2.4.3. Statusul imunității.....	5
1.2.4.4. Mediul înconjurător poluat.....	5
1.2.4.5. Expuneri ocupaționale.....	5
1.2.4.6. Ereditate .....	6
1.3 Aspecte macroscopice și microscopice .....	6
1.3.1. Carcinogeneza .....	6
1.3.2. Micro-mediul tumoral (TME) .....	7
1.3.3. Afecțiunile cu potențial de malignizare și displaziile .....	8
1.3.4. Clasificarea tumorilor: OMS și profilul expresiei genice.....	9
1.3.5. Stadializarea cancerului oral.....	9
1.3.6. Biomarkerii .....	10
1.3.7. Studii experimentale pentru cancerul oral .....	11
2. Tehnici non-invasive de depistare și diagnostic al leziunilor patologice din sfera oro-facială ....	12
2.1 Colorația vitală .....	14
2.1.1. Colorația cu albastru de toluidine.....	14
2.1.2. Colorația cu albastru de metilen.....	15
2.1.3. Colorația cu roz Bengal .....	15
2.1.4. Colorația cu soluție Lugol.....	15
2.2 Sisteme de detecție bazate pe lumină .....	16
2.2.1. Chemiluminescența .....	16
2.2.2. Autofluorescența/VELscope.....	18
2.2.3. Diagnosticul fotodinamic.....	19
2.3. Tehnologii optice de diagnostic .....	20
2.3.1. Spectroscopia Raman .....	20

2.3.2. Spectroscopia elastică dispersată.....	20
2.3.3. Spectroscopia cu reflectanță dispersată .....	21
2.3.4. Imagistica cu bandă îngustă .....	21
2.3.5. Tomografia în coerență optică .....	22
2.3.6. Endomicroscopia laser confocală .....	23
2.3.7. Microscopia cu reflectanță confocală .....	23
2.4 Biomarkeri salivari .....	24
<b>PARTEA SPECIFICĂ .....</b>	<b>25</b>
3. Prototipuri de sisteme OCT .....	25
3.1.En-face time domain OCT (TD-OCT) .....	25
3.2. Spectral domain OCT (SD-OCT) .....	28
3.3. Rezultate clinice .....	30
3.3.1. Țesuturi dure dentare (leziuni necarioase).....	31
3.3.1.1. Suprasolicitare ocluzală .....	31
3.3.1.2. Abfracție și atriție .....	31
3.3.2. Obturații dentare .....	34
3.3.3. Tratament endodontic.....	35
3.3.4. Articulație temporo-mandibulară .....	37
3.3.5. Ortodonție.....	37
3.3.6. Implantologie .....	38
3.3.7. Protetică dentară .....	41
3.3.8. Instrument de mână pentru scanare OCT .....	43
3.3.9. Concluzii .....	44
3.4. Contribuții proprii privind diagnosticul non-invaziv al patologiei orale utilizând Tomografia în Coerență Optică .....	45
3.4.1. Context actual.....	45
3.4.2. Metodologie .....	47
3.4.2.1. Probele de țesut moale oral .....	47
3.4.2.2. Protocol experimental .....	48
3.4.3. Rezultate și discuții .....	52
3.4.3.1. Investigarea probelor cu OCT .....	52
3.4.3.2. Investigarea probelor cu Micro-CT .....	54
3.4.3.3. Validarea histopatologică .....	54
3.4.4. Concluzii .....	55
4. Contribuții proprii privind diagnosticul non-invaziv al patologiei orale utilizând autofluorescența țesuturilor.....	56
4.1. Introducere .....	56
4.2. Material și metodă .....	57
4.3. Rezultate .....	59
4.4. Discuții .....	62
4.5. Concluzii.....	64
5. Contribuții proprii privind diagnosticul non-invaziv al patologiei orale utilizând microARN-urile salivare .....	66
5.1. Introducere .....	66

5.2. Material și metodă .....	67
5.2.1. Criterii de includere .....	67
5.2.2. Recoltarea și pregătirea probelor .....	67
5.2.3. Colectarea salivei .....	67
5.2.4. Izolarea ARN-ului .....	67
5.2.5. Cuantificarea miARN-ului .....	68
5.2.6. Analiza statistică .....	68
5.3. Rezultate .....	68
5.4. Discuții .....	69
5.5. Concluzii și direcții viitoare .....	71
6. Contribuții proprii privind valoarea prognostică a PET/CT-ului în diagnosticul non-invaziv al patologiei orale.....	72
6.1. Introducere .....	72
6.2. Material și metodă .....	74
6.2.1. Depistarea leziunilor recurente .....	74
6.2.2. PET/CT pentru planificarea IMRT .....	76
6.2.3. Metastaze la distanță și carcinom primar secundar.....	77
6.2.4. Carcinom primar necunoscut .....	78
6.2.5. Metastaze nodulare oculte.....	79
6.3. Rezultate și discuții.....	80
6.3.1. Valoarea prognostică a scanării PET .....	82
6.3.2. Noi indicatori radio-activi pentru PET .....	82
6.4. Concluzii.....	83
7. Contribuții proprii privind diagnosticul non-invaziv al patologiei orale utilizând laser Doppler flowmetria.....	84
7.1. Introducere .....	84
7.2. Material și metodă .....	85
7.2.1. Criterii de includere.....	85
7.2.2. Criterii de excludere.....	85
7.2.3. Designul studiului .....	86
7.3. Rezultate și analiză statistică.....	88
7.4. Discuții .....	90
7.5. Concluzii .....	91
<b>Concluzii și contribuții personale .....</b>	<b>92</b>
<b>Bibliografie .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXE .....</b>	<b>I</b>

## I. INTRODUCERE

Patologia neoplazică reprezintă o preocupare permanentă a lumii medicale. Magnitudinea problemei este dată de numărul mare de cazuri cu acest tip de patologie, mortalitatea ridicată și nu în ultimul rând de costurile mari aferente tratării acestui tip de patologie. Depistarea precoce a acestor afecțiuni reprezintă punctul forte al îmbunătățirii supraviețuirii prin diminuarea timpului de stabilire a diagnosticului. **Motivația alegerii temei de cercetare** este plasarea tehnicilor de investigare non-invazivă în algoritmele de diagnostic și terapie pentru patologia oro-facială. Medicul stomatolog generalist este "prima linie de apărare" pentru pacienții simptomatici și asimptomatici<sup>11</sup>, și de aceea implementarea unor protocoale de screening bine stabilite are o importanță extrem de mare.

**Importanța și actualitatea tezei** constă în faptul că patologia neoplazică a țesuturilor moi orale reprezintă o problemă de importanță globală, incidența acestei boli fiind în continuă creștere iar prezentarea la medic în stadii finale a devenit comună. Această teză de doctorat are o **relevanță deosebită atât la nivel național, cât și european**, deoarece abordează probleme legate de dezvoltarea și aplicarea unor terapii inovative cu mare impact asupra eficienței și calității diagnosticului în domeniul medical. La ora actuală sunt promovate la nivel internațional tehnologiile minim invazive, nedureroase și cu eficiență maximă.

**Obiectivele** propuse spre rezolvare în cadrul acestei teze vizează optimizarea metodelor de identificare precoce a displaziilor și carcinoamelor orale. Obiectivele specifice ale tezei s-au orientat spre studiul îmbunătățirii prevenției în medicina dentară prin diagnostic precoce neinvaziv cu ajutorul tehnicii Optical Coherence Tomography (OCT) *en-face*, autofluorescenței (sistemul Velscope), microARN-urilor salivare, PET/CT-ului, laser Doppler flowmetria comparativ cu metodele convenționale (analiza histopatologică).

Pentru un număr mare de neoplasme oro-faciale sunt cunoscute anumite stări precanceroase, depistarea acestora și tratarea lor realizând de fapt profilaxia neoplaziei. Introducerea tehnicii OCT ar conduce la o simplificare a evaluării periodice a potențialilor subiecți, evitarea biopsiilor inutile, cu reducerea complicațiilor și riscurilor acestor manevre terapeutice invazive.

Ca atare, prezenta teză și-a propus investigarea abilității acestor tehnici pentru detecția leziunilor premaligne și maligne din sfera oro-facială. S-au utilizat un prototip OCT *en-face* (1300 nm) și un prototip OCT Spectral (810 nm) existente în cadrul Facultății de Medicină Dentară din Timișoara alături de un sistem OCT Swept Source pus la dispoziție de echipa de cercetare de la Universitatea Kent (UK), care și-a exprimat acordul colaborării în acest proiect de cercetare. De asemenea, s-a utilizat sistemul Velscope pentru evaluarea autofluorescenței tisulare, s-a evaluat expresia salivară a unui panel de miARN-uri în vederea stabilirii potențialului lor ca biomarkeri non-invazivi și s-a evaluat fezabilitatea PET/CT-ului pentru diagnosticul și monitorizarea terapiilor din cancerul oral. Laser Doppler flowmetria s-a utilizat pentru evaluarea fluxului sangvin gingival și pentru monitorizarea vindecării zonelor identificate ca fiind inflamate. Rezultatele obținute mult mai rapid prin aceste metode ar putea permite inițierea precoce și aplicarea unor terapii minim invazive.

# PARTEA GENERALĂ

## 1. DATE ESENȚIALE DESPRE PATOLOGIA ȚESUTURILOR MOI ORALE

Prevalența cancerului oral este de două, trei ori mai mare la bărbați decât la femei pentru majoritatea grupurilor etnice [<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>]. Rapoartele de la nivel global, grupează cancerule din toate regiunile cavității orale și faringelui și împreună ocupă locul șase al celor mai comune cancerule din lume. Zonele care sunt în mod specific caracterizate de incidență crescută a cancerului oral sunt Asia de Sud și Sud-Est (Sri Lanka, India, Pakistan and Taiwan), aria Europei de Vest (Franța) și Est (Ungaria, Slovacia and Slovenia), America Latină și insulele Caraibe (Brazilia, Uruguay și Puerto Rico) și regiunile Pacificului (Papua Noua Guinee și Melanezia). Cancerul oral este o patologie care poate fi prevenită, întrucât factorii de risc majori (fumatul și alcoolul) sunt prezenți în 90% din cazuri, având inclusiv un efect sinergic. Printre factorii de risc ai acestei patologii se întâlnește și HPV (asociat în mod principal cu carcinomul orofaringelui) și radiațiile ultraviolete. Există studii științifice care au demonstrat diferențe între flora microbiană a indivizilor sănătoși și cea a celor cu CSCO și prin care se sugerează o asociere între cancerul oral/faringian și încărcătura bacteriană (ex. Igienă orală deficitară, status dentar precar, parodontită marginală cronică). Există studii epidemiologice care au demonstrat că o dietă bogată în legume și fructe, cu conținut redus de produse animale se asociază cu un risc redus de a dezvolta cancer oral sau faringian. Pacienții care au suferit transplante de organe sau pacienții HIV-pozitivi prezintă un indice mai crescut la cancerul de buză, cavitate orală și faringe decât restul populației. În literatura de specialitate nu există un acord în acest sens însă există studii care atestă că în unele zone din Taiwan, cu rate alarmant de crescute ale cancerului oral, s-au observat concentrații crescute de metale grele carcinogenetice (arsenic, crom, nichel). De-a lungul timpului s-au raportat asocieri între cancerul oral/faringian și diverse ocupații (ex. pictura, metalurgia, operator mașinărie, tâmplărie, construcții etc). Există un risc crescut de HNSCC pentru pacienții cu aumite condiții ereditare, incluzând discheratoza congenitală, anemia Fanconi și sindromul Bloom.

Cel mai probabil carcinogeneza începe cu transformarea unui număr limitat de keratinocite normale. Această transformare poate fi exprimată prin modificări citogenetice și procese epigenetice care alterează progresia ciclului celular, a mecanismelor de reparație ADN, a diferențierii și apoptozei celulare, care pot fi cauzate de mutații accidentale prin expunerea la o varietate de factori biologici sau carcinogeni sau pur și simplu prin erori apărute în procesul de reparație al ADN-ului, rezultând astfel un keratinocit instabil, conducând la un câmp pre-carcinogenic și la modificări maligne, putând transmite aceste alterări clonelor lor. Cele mai comune leziuni ale epiteliului care pot fi depistate și care au potențial de malignizare sunt leucoplazia și eritroplazia.

Cele mai comune zone de prezentare ale cancerului oral sunt limba (fața ventrală și laterală, 40% din cazuri), planșeul (30% din cazuri) și buza inferioară<sup>60</sup>. În timpul examenului clinic indiferent de gradul de accesibilitate la cavitatea orală, cancerul oral se diagnostichează de cele mai multe ori în stadii avansate. Cele mai comune motive pentru acest lucru sunt erorile inițiale de diagnostic, lipsa de pregătire a clinicienilor sau ignoranța pacienților, care scad evident șansele de supraviețuire în pofida strategiilor terapeutice avansate.

## 2. TEHNICI NON-INVAZIVE DE DEPISTARE ȘI DIAGNOSTIC AL LEZIUNILOR PATOLOGICE DIN SFERA ORO-FACIALĂ

COE, incluzând inspecția vizuală și palparea, reprezintă metodele de rutină ale screeningului pentru leziunile orale. Cu toate acestea, leziunile subtile pot trece neidentificate, diagnosticul diferențial între leziunile benigne, premaligne și maligne fiind îngreunat. S-a raportat că displazia sau carcinomul microinvasiv pot avea loc în mucoasa care clinic pare sănătoasă<sup>68</sup>.

În prezent, biopsiile orale cu evaluare histologică, rămân standardul de aur pentru diagnosticul oral al APM-urilor. Cu toate acestea, cât timp este invazivă, unii pacienți pot să nu accepte această investigație, mai ales când leziunea pare "normală". Adicional, variabilitatea intra și între-observatori și subiectivismul sunt foarte comune în diagnosticul APM-urilor și cancerului oral. Rezultatele pot fi afectate de dimensiunea și profunzimea biopsiei, calitatea specimenului, de tehnicile de fixare și de congelare și de experiența anatomo-patologului<sup>69</sup>.

Prin urmare, sunt necesare tehnici non-invazive de depistare a APM-urilor orale. În acest sens, în ultimele decenii, s-au dezvoltat o gamă largă de tehnici non-invazive. Cu toate acestea, este dificil pentru clinicieni să decidă care instrument diagnostic este cel mai adecvat și util pentru screeningul APM-urilor.

Tehnicile de diagnostic non-invazive ce pot fi utilizate pentru identificarea APM-urilor se împart în patru categorii: colorarea vitală cu soluții care pot fi utilizate sub formă de apă de gură sau care se aplică direct pe zona suspectă; sisteme de detecție bazate pe lumină; tehnici de diagnostic optic care folosesc semnale optice returnate ce reflectă modificări morfologice și structurale ale țesuturilor și markeri salivari.

## PARTEA SPECIFICĂ

### 3. PROTOTIPURI DE SISTEME OCT

Evoluția OCT-ului în ultimele decenii a făcut ca această tehnică să devină o puternică modalitate imagistică pentru structurile transparente și translucide<sup>161,162</sup>. OCT-ul se bazează pe interferometrie de coerență joasă (LCI), prin care se pot obține cuantificări la scări micronice. Un sistem LCI se bazează pe interferometria cu două fascicule.

#### 3.1. EN-FACE TIME DOMAIN OCT (TD-OCT)

Colectarea mai multor A-scan-uri din diverse poziții transversale adiacente generează imagini B-scan. Liniile din rețeaua generată corespund A-scan-urilor și sunt orientate de-a lungul coordonatei de profunzime. Imaginile B-scan pot fi produse și din T-scan-uri la diferite profunzimi. În cazul acestor T-scan-uri, scanner-ul transversal produce liniile rapide din imagine, controlând fie scanner-ul transversal de-a lungul axei coordonate X (orizontală), de-a lungul axei de coordonate Y (verticală) sau de-a lungul unui unghi polar  $\theta$ , în timp ce celelalte două dispozitive de scanare rămân fixe. Această procedură are un avantaj clar în comparație cu procedura A-scan bazată pe B-scan-uri, întrucât permite producerea imaginilor OCT transversale (sau *en-face*) pentru o cale de referință fixă; astfel de imagini se numesc C-scan-uri.

Procedura de scanare este similară cu cea utilizată în orice microscop confocal, în care scanarea rapidă este *en-face* (linie etalon, utilizând un scanner galvanometric SX) și cadrul de scanare este mult mai redus (la o frecvență de imagine, utilizând scannerul galvanometric SY).

În imaginile prezentate în acest manuscris, nu s-a folosit nici o altă modulație de fază în afara celei introduse de scannerul galvanometric, determinând astfel linia din rastru.

### 3.2. SPECTRAL DOMAIN OCT (SD-OCT).

În SD-OCT se măsoară spectrul semnalului de ieșire al LCI. O transformare Fourier a spectrului achiziționat livrează o imagine A-scan, fără nicio mișcare a brațului de referință. Datorită faptului că toate profunzimile sunt obținute într-o măsurătoare, atât viteza de generare a imaginilor B-scan cât și raportul semnal-zgomot se îmbunătățesc dramatic în comparație cu TD-OCT. Un neajuns al SD-OCT este acela că nu poate asigura o producție rapidă a imaginilor *en-face* sau o adâncime de pătrundere axială mai mare decât a celor obținute cu TD-OCT. SD-OCT poate fi implementat în două moduri: swept source OCT (SS-OCT) și bazat pe cameră sau pe spectrometru (Sp-OCT). În unele publicații de specialitate, una sau ambele metode sunt menționate ca metode Fourier Domain OCT. Ambele metode au fost utilizate pentru realizarea unor dispozitive OCT asamblate de către grupul nostru, prezentând mai departe rezultatele obținute folosind principiul SS-OCT.

### 3.3. REZULTATE CLINICE

Supraolicitarea ocluzală reprezintă o îngrijorare majoră pentru medicii dentiști datorită consecințelor sale de nedorit, care includ uzura dentară excesivă (atriția patologică și abfracțiile), fractura coroanei și/sau rădăcinii, eșecul restaurărilor protetice și afecțiuni ale articulației temporo-mandibulare. În astfel de cazuri este esențială stabilirea unui diagnostic precoce. Grupul nostru a demonstrat că OCT-ul reprezintă o alternativă promițătoare și neinvazivă de depistare precoce și monitorizare a surasolicitării ocluzale în cazul pacienților bruxomani<sup>168</sup>. *En-face* TD-OCT-ul și microscopia cu fluorescență au fost utilizate pentru investigarea uzurii dinților anteriori ai unor pacienți tineri cu bruxism activ (puternic, inconștient și cu frecare ritmică sau/și strângerea din dinți în timpul zilei sau în timpul somnului, cauzat în principal de nivele crescute de stres emoțional și de interferențe ocluzale din timpul mișcărilor protruzive sau de lateralitate). Dinții au prezentat uzură patologică de gradul întâi stabilită printr-un index de uzură (TWI), care a fost propus de Smith and Knight în 1984 pentru stabilirea uzurii celor patru suprafețe dentare vizibile. În studiul nostru indicele TWI a fost egal cu 1 (prezentând pierderea caracteristicilor de suprafață ale smalțului fără expunerea dentinei, cu o pierdere minimă a formei). Combinarea informațiilor colectate prin investigația OCT și prin microscopie cu fluorescență au condus la descoperirea unui patern caracteristic de fisuri ale smalțului care au ajuns la suprafața dentară.

*En-face* TD-OCT a fost utilizat și pentru investigarea dinților anteriori cu o morfologie coronară normală (fără atriție patologică), care au provenit atât de la pacienți cu bruxism activ de gradul 1 diagnosticați utilizând dispozitivul BiteStrip cât și de la pacienți fără parafuncții. Grupul nostru de cercetare a realizat descrierea caracterizărilor microstructurale ale abfracțiilor prin *en-face* TD-OCT. Acest instrument pare promițător în examinarea calității structurale al obturațiilor dentare, precum și în evaluarea calității tratamentelor endodontice și a obturațiilor de canal. Într-un studiu preliminar, s-a identificat caracterizarea microstructurală a discului temporo-mandibular prin utilizarea ambelor sisteme OCT, și anume *en-face* TD-OCT și SD-OCT. Sistemul *en-face* TD-OCT sistem prezentat în Figura 1 a fost de asemenea utilizat în studiile noastre pentru evaluarea conexiunii dintre bracketii ortodontici și structura dentară. Calitatea inserării implanturilor poate fi investigată analizând interfața dintre implant și os. S-au inițiat două studii de simulare numerică și amprente tensionale. Ambele au demonstrat că *en-face* TD-OCT este capabil să evalueze morfologia interfețelor dintre implant și os. Comutarea secvențială și rapidă dintre regimul *en-face* și cel al secțiunilor transversale, specifică pentru tehnologia *en-face* TD-OCT reprezintă un avantaj semnificativ în investigarea non-invazivă a restaurărilor protetice dentare.

Câteva variante de probe de mână pentru scanarea OCT au fost dezvoltate de grupul nostru, din dorința de a le face cât mai ușoare, simple și ieftine posibil. Am



demonstrat că aceste probe se pot construi aproape în întregime din piese universale și că pot avea un design ergonomic.

O probă de mână dezvoltată de grupul nostru este deja utilizată într-un studiu *in vivo* în desfășurare într-un mediu clinic. Dezvoltarea probelor de mână face parte din efortul nostru de a extinde investigațiile clinice de la *ex vivo* la *in vivo*.

### **3.4 CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND DIAGNOSTICUL NON-INVAZIV AL PATOLOGIEI ORALE UTILIZÂND TOMOGRAFIA ÎN COERENȚĂ OPTICĂ SCOP**

Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua și compara caracteristicile oferite de investigația OCT în asociere cu micro-CT-ul în vederea stabilirii diagnosticului precoce al patologiei maligne orale. În acest sens s-au folosit probe de țesut oral atât proaspete cât și plastinate iar validarea s-a realizat prin examen anatomo-patologic.

#### **PARTE EXPERIMENTALĂ**

Au fost colectate 12 biopsii de la nivelul țesuturilor orale ale pacienților spitalizați în Clinica de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială din Timișoara. Biopsia incizională s-a realizat de către același chirurg, care a recoltat o probă de țesut sănătos din apropierea leziunii suspecte și o probă de țesut de la nivelul leziunii suspecte de CSCO. Biopsia excizională s-a realizat conform protocolului standard iar jumătate din ea a fost direcționată către anatomo-patolog, în timp ce cealaltă jumătate a fost direcționată către investigarea OCT și Micro-CT. Probele de țesut au fost depozitate în recipiente sterile și au fost păstrate în formalină 10% tamponată.

Investigația OCT a fost realizată în aceeași zi cu excizia biopsică pentru toate cazurile și pentru toate probele de țesut. Pentru imagistica OCT s-a utilizat un prototip OCT *en-face* lucrând în Time Domain Mode la 1300 nm. Rezoluția transversală și în profunzime a fost de 10 -15  $\mu\text{m}$  (în aer). Probele au fost plasate la o distanță confortabilă de 2.5 cm. Probele au fost poziționate pe un support și determinările au fost realizate de aceeași persoană pentru toate probele, în toate cazurile. Pentru asigurarea unei co-registrări de acuratețe a probelor supuse la investigația OCT s-a utilizat fotografia digitală.

Toate probele au urmat procesul de plastinație, și au fost re-examinate atât cu sistemul OCT cât și cu Micro-CT-ul.

Validarea determinărilor OCT se va realiza prin imagini de microtomografie computerizată cu radiație sincrotron (Micro-CT) (Synchrotron –Radiation Micro-CT Elettra, Trieste ce utilizează evaluarea cu fotoni, mult mai puternică și mai exactă decât sistemele clasice de Micro-CT) și prin interpretări histologice.

#### **REZULTATE**

Imaginile obținute de la probele de țesut sănătoase au demonstrat o structură uniformă a țesutului investigat fără nici un semn de modificări anormale ale morfologiei lor. A fost posibilă identificarea aspectelor de interes cum ar fi stratul keratinizat, stratul epitelial, membrana bazală și lamina propria. Arii de CSCO de la nivelul mucoasei bucale au fost identificate în imaginile OCT ale probelor patologice. S-au putut observa întreruperi ale membrane bazale, un strat epitelial extrem de variabil în grosime, cu arii de eroziune și invazie epitelială la nivelul straturilor subepiteliale. Pentru probele de țesut plastinate a fost posibilă o mai bună interpretare a morfologiei tisulare, putând obține și o interpretare mai bună a imaginilor OCT. Reconstrucția 3D s-a obținut de către membrul grupului nostru de cercetare de la Ancona utilizând un software specific, cum ar fi X-TRACT, ImageJ, etc. Datorită absorbției reduse de radiații X a țesuturilor moi neminerilizate și a lipsei unor agenți de contrast utilizarea imagisticii radiografice bazate pe topografie a unor probe biologice mici a fost limitată.

În urma examenului anatomo-patologic s-a confirmat diagnosticul de carcinom scuamos celular oral la toate probele investigate. Datorită diferențelor dintre cele două tehnici diagnostice, nu toate caracteristicile obținute prin rezultatul histopatologic au putut fi comparate cu rezultatele obținute din investigarea OCT.

## CONCLUZII

Acesta este un studiu preliminar prin care s-au comparat caracteristicile oferite de investigația OCT și micro-CT. În condițiile prezentului studiu, OCT s-a dovedit a fi o modalitate imagistică **rapidă, în timp real, 3-D și non-invazivă** extrem de promițătoare pentru diagnosticul malignităților orale. Plastinația se poate utiliza pentru îmbunătățirea imaginilor optice ale probelor de țesut moale oral datorită creșterii contrastului și stabilității acestora, ușurinței de manipulare și posibilității de a face determinări repetate.

## 4. CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND DIAGNOSTICUL NON-INVAZIV AL PATOLOGIEI ORALE UTILIZÂND AUTOFLUORESCENȚA ȚESUTURILOR

### SCOP

Obiectivele acestui studiu au fost: (i) evaluarea capacității VELscope-ului de a vizualiza leziunile orale cu potențial malign sau maligne; (ii) acuratețea diagnosticului, sensibilitatea și specificitatea metodei, validând datele prin examen histopatologic – care reprezintă standardul de aur.

### MATERIAL ȘI METODĂ

În prezentul studiu, 10 pacienți internați în Spitalul Clinic Municipal de Urgențe Timișoara, Secția de Chirurgie Maxilo-Facială, au fost evaluați prin examinare orală convențională (EOC) urmată de evaluare vizuală directă a fluorescenței (EVDF) utilizând sistemul VELscope. Zonele suspecte clinic la EOC sau cu EVDF pozitivă (pierdere vizuală a fluorescenței (PVF)) au urmat biopsie chirurgicală. Asocierea dintre EOC și EVDF s-a evaluat și comparat cu analiza histopatologică.

De-a lungul studiului, toate examinările vizuale și tactile intra-orale urmate de examinările fluorescenței au fost realizate de același clinician. Toți subiecții au urmat o inspecție a următoarelor zone: buze, mucoasă bucală și labial, partea dorsală, ventral și zonele laterale ale limbii, palatal moale și palatal dur, uvula și orofaringele.

### REZULTATE

Rezultatele histopatologice care au prezentat malignitate invazivă au fost considerate pozitive. Opt cazuri la care biopsiile au confirmat leziunile maligne au fost detectate inițial prin EOC și EVDF (adevărat pozitive). Doar un caz cu rezultat negativ al biopsiei (fiind vorba de o leziune premalignă) nu a fost în concordanță cu EOC și EVDF (fals pozitiv). În timp ce o leziune considerată non-malignă în urma investigării cu VELscope-ul și cu EOC a fost confirmată și de rezultatul anatomo-patologic (adevărat negativ).

Examinarea histologică a acestor leziuni a arătat că sistemul VELscope a prezentat o sensibilitate de 100% și o specificitate de 50% în discriminarea mucoasei normale de carcinomul in situ (CIS) sau de carcinomul invaziv, atunci când a fost comparat cu histopatologia. Valoarea predictivă pozitivă a fost de 88.89% iar cea negativă de 100% (95% CI).

## CONCLUZII

Am descoperit că sistemul de EVDF directă folosit în studiul nostru nu poate înlocui în totalitate procedura de analiză histopatologică, care încă reprezintă standardul de aur. Cu toate acestea, și-a dovedit complet utilitatea pentru examinarea clinică, pentru monitorizarea leziunilor orale și înainte de realizarea biopsiilor. De aceea, acest aparat poate adăuga sensibilitate examinării țesuturilor orale și poate fi o metodă adjuvantă eficientă în cazul pacienților cu risc crescut.

## **5. CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND DIAGNOSTICUL NON-INVIZIV AL PATOLOGIEI ORALE UTILIZÂND MICROARN-URILE SALIVARE**

### **SCOP**

Scopul acestui studiu, a fost acela de a valida expresia salivară a unui panel de 5 molecule microARN, identificate în urma unui screening al literaturii de specialitate. Aceștia au fost evaluați ca potențiali biomarkeri non-invazivi atât în diagnosticul CSCO, cât și pentru monitorizarea terapiei acestui tip de patologie.

### **MATERIAL ȘI METODĂ**

Probele biologice au fost colectate de la pacienți înainte de biopsie. Au fost investigați un număr de 8 pacienți, dintre care: 4 cu diagnostic de CSCO spitalizați la Spitalul Clinic Municipal de Urgențe Timișoara, Secția de Chirurgie Maxilo-Facială, constituind grupul de studiu și 4 pacienți sănătoși alcătuind grupul control. Informația clinic-patologică a pacienților incluși în cele două grupuri s-a obținut din dosarele lor medicale. Pacienții (cu o vârstă medie de 61 ani) și indivizii din lotul control (cu o vârstă medie de 66 ani) au fost rugați să se abțină de la mâncat, băut și periat pe dinți o oră înainte de a li se recolta 2 ml de salivă; fiecare probă a fost mixată cu 1 ml reactiv RNAlater® Solution (Ambion™) și depozitat la – 20°C până la utilizarea ei ulterioară. A urmat izolarea ARN-ului și cunatificarea microARN-urilor.

După ce s-a verificat dacă valorile Ct normalizate sunt distribuite normal, s-a utilizat un two tails student t-test heteroscedastic pentru a stabili dacă nivelul expresiilor microARN este semnificativ diferit în saliva pacienților cu CSCO în comparație cu grupul control.

### **REZULTATE**

Cu excepția miR-181b, toate moleculele microARN investigate s-au dovedit a avea expresii neregulate în saliva pacienților cu CSCO. hsa-miR-137 s-a dovedit a fi supraexprimat în saliva pacienților cu CSCO în timp ce, hsa-miR-205 s-a dovedit a fi puternic subexprimat. De asemenea, a fost confirmată activarea expresiei hsa-miR-127-5b și o puternică subexprimare a hsa-miR-375 în saliva pacienților cu CSCO. În prezentul studiu, nivelul expresional al hsa-miR-181 nu a fost găsit a fi modificat în salivă. Puterea statistică a testelor noastre este destul de limitată și analiza t-test nu a demonstrat nici o semnificație statistică, fapt ce era de așteptat, dat fiind dimensiunea mică a celor două grupuri.

### **CONCLUZII ȘI DIRECȚII VIITOARE**

În lumina articolelor publicate anterior și a prezentului studiu preliminar, putem considera că aceste molecule, pot deține un rol important în patogeneza tumorală orală. Utilizarea moleculelor microARN ca și potențiali biomarkeri în probele de salivă reprezintă o analiză non-invazivă promițătoare pentru evaluarea riscului de malignitate orală, ce poate adăuga valoare rezultatului histo-patologic.

## **6. CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND VALOAREA PROGNOSTICĂ A PET/CT-UL ÎN DIAGNOSTICUL NON-INVIZIV AL PATOLOGIEI ORALE**

### **SCOP**

În acest capitol s-a evaluat utilitatea tehnologiei PET pentru: identificarea bolii recurente în etapa post-tratament, evaluarea răspunsului după terapia chimio-iradiantă, a metastazelor la distanță sau a tumorilor primare apărute după un alt proces tumoral precum și a tumorilor primare necunoscute. S-au discutat inclusiv limitările PET pentru depistarea

ganglionilor ocuți alături de noile dezvoltări în această tehnică imagistică care poate avea impact pe viitor în diagnosticul și tratamentul CSCO.

## **MATERIAL ȘI METODĂ**

În raport cu datele din literatura de specialitate am încercat să exemplificăm abilitatea acestei modalități de diagnostic prin selectarea unui caz al unui pacient care a solicitat clarificarea stadiului său actual vis-à-vis de leziunea și diagnosticul inițial.

## **REZULTATE**

### **DETECTAREA LEZIUNILOR RECURENTE**

Evaluarea bolii recurente după terapia HNSCC a fost una dintre cele mai răspândite aplicații ale FDG-PET. Scanurile FDG-PET realizate la intervale precoce de la terapie pot conduce la rezultate false datorită efectelor inflamatorii generate de terapia chimio-iradiantă sau iradiantă.

### **PET/CT PENTRU PLANIFICAREA IMRT**

Recent s-au realizat dezvoltări tehnologice pentru planificarea terapiei iradiante cu intensitate modulată (IMRT) prin utilizarea PET/CT. Aceste descoperiri prezintă dovezi conflictuale în ceea ce privește utilitatea PET/CT în comparație cu CT-ul cu contrast convențional atunci când se iau în considerare obținerea volumului targetat brut (GTV) și planificarea IMRT.

### **METASTAZE LA DISTANȚĂ ȘI CARCINOM PRIMAR SECUNDAR**

FDG-PET reprezintă o aplicație excepțională pentru stadializarea inițială întrucât poate oferi o imagine de ansamblu a metastazelor la distanță, a metastazelor de la nivelul nodulilor limfatici, a potențialelor carcinoame primare la distanță și chiar a carcinoamelor primare.

### **CARCINOM PRIMAR NECUNOSCUȚ**

În cazurile cu carcinom primar necunoscut descoperite prin examinare clinică, laringoscopie clinică și imagistică în secțiuni transversale (CT sau RMN) se recomandă în general ca pacienții să fie supuși și scanării PET/CT înainte de biopsiere. Poate fi util pentru ghidarea intraoperatorie a biopsierii prin identificarea zonelor cu absorbție crescută pe imaginile PET/CT. Poate fi sugestiv pentru localizare, profunzime și agresivitate. Pentru aproximativ 25% dintre pacienți, scanarea PET/CT poate ajuta la stabilirea corectă a site-urilor primare. Un factor critic pentru identificarea de acuratețe a malignităților primare necunoscut, rămâne expertiza clinică a examinatorului.

### **METASTAZE NODULARE OCULTE**

Datorită sensibilității limitate a PET/CT, nu se recomandă utilizarea lui pentru identificarea metastazelor nodulare limfatice oculte.

### **VALOAREA PROGNOSTICĂ A SCANĂRII PET**

Există dovezi că valoarea de absorbție standardizată (VAS) măsurată prin FDG-PET pentru HNSCC poate avea valoare prognostică. Nivelul VAS pentru scanurile PET care identifică boala recurentă a fost corelat puternic atât cu rata de supraviețuire generală cât și cu lipsa recidivei<sup>242</sup>. Pacienții cu VAS mai mare de 6 au prezentat o perioadă de 2 ani fără recidive de doar 10%, în timp ce pacienții cu VAS mai mic ca 2 au avut o supraviețuire fără recidive de 85%.

### **NOI INDICATORI RADIO-ACTIVI PENTRU PET**

PET reprezintă o tehnică care poate identifica emisia pozitronilor de la o varietate de izotopi radioactivi incluzând carbon-11, oxygen-15, și nitrogen-13, adițional lui fluorine-18. Unii indicatori au prezentat potențial crescut în localizarea selectivă a tumorilor maligne<sup>258</sup>. Un acid amino-carbonic (11C-metionin) poate fi utilizat ca marker surrogat pentru metabolismul proteic, având un potențial extrem de specific pentru localizarea tumorilor. 18-Fluorothy-midine (FLT) este fosforilat de kinaza timidinică capabilă să relice sinteza ADN. FLT este corelat în general cu proliferarea tumorală demonstrând rezultate încurajatoare.

## **CONCLUZII**

FDG-PET reprezintă o tehnică extrem de acceptată în evaluarea HNSCC. Cu toate acestea, deocamdată, nu poate fi considerată ca substituent pentru examinarea clinică și endoscopică atentă. PET/CT reprezintă un instrument extrem de util pentru depistarea HNSCC recurent. În aceste cazuri, PET este moderat specific, dar foarte sensibil. Valorile predictive negative sunt crescute, fapt considerat reconfortant atât pentru clinician, cât și pentru pacient. Valorile predictive pozitive sunt mai reduse datorită rezultatelor fals pozitive datorate infecțiilor, inflamațiilor, biopsiilor sau zonelor post-tratament. Pentru scanarea PET/CT este recomandat un interval de 3 luni sau mai mare după finalizarea terapiei iradiante. O aplicație controversată pentru PET/CT rămâne planificarea terapiei iradiante cu intensitate modulată. În aproximativ 20% din cazuri poate fi utilizat în identificarea zonelor cu al doilea carcinom primar sau cu metastaze la distanță. PET nu este recomandat în depistarea nodulilor oculți. Indicatorii radio-activi recenți pot fi utili în identificarea, pe un scan PET/CT, a zonelor de hipoxie, a metabolismului proteic, a replicării ADN și a altor procese legate de malignitate.

## **7. CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND DIAGNOSTICUL NON-INVAZIV AL PĂTOLOGIEI ORALE UTILIZÂND LASER DOPPLER FLOWMETRIA**

### **SCOP**

Acest studiu are ca scop evaluarea valorilor FSG în cazul pacienților cu gingivită pe o perioadă de 14 zile utilizând LDF.

### **MATERIAL ȘI METODĂ**

În studiu au fost incluși 10 pacienți (7 femei și 3 bărbați) cu vârste cuprinse între 20 și 30 de ani. Înregistrările FSG s-au realizat de la nivelul a 20 de zone sănătoase, acestea reprezentând grupul control și de la nivelul a 20 de zone cu gingivită moderată, reprezentând grupul cu gingivită.

Studiul a fost împărțit în 4 etape: 1) evaluarea determinărilor LDF înainte de inițierea oricărui alt tratament (pentru ambele grupuri); 2) re-evaluarea determinărilor LDF la 24 h; 3) re-evaluarea determinărilor LDF la 7 zile și 4) re-evaluarea determinărilor LDF la 14 zile de la terapia inițială pentru grupul cu gingivită. În ședințele doi, trei și patru (la 24 h, la 7 zile și la 14 zile), s-au realizat re-evaluările determinărilor LDF pentru grupul cu gingivită.

### **REZULTATE ȘI ANALIZA STATISTICĂ**

Determinările LDF (inițial, la 24 h, la 7 zile și la 14 zile) au fost observate și analizate din punct de vedere matematic utilizând soft-ware-uri de analiză dedicate, MoorSoft Windows®/ MoorLAB, v2.01. S-a putut observa o creștere evidentă a FSG la 24 h și la 7 zile comparativ cu valorile din grupul control. După 7 zile valorile tind să scadă însă tot nu ating punctual inițial. Doar după 14 zile FSG s-a îmbunătățit în comparație cu valorile inițiale ale determinărilor LDF și s-au apropiat de valorile grupului control. Pentru verificarea diferențelor dintre valorile FSG s-a aplicat analiza măsurătorilor repetate One-Way ANOVA. Valorile inițiale ale celor două grupe au fost comparate și s-a observat o diferență semnificativ statistică ( $p < 0.01$ ) între cele două grupuri. Însă după 14 zile valorile FSG nu mai prezintă diferențe semnificativ statistice când sunt comparate cu grupul control (Tabel 12).

## **CONCLUZII**

O perioadă de cel puțin 14 zile ar trebui luată în considerare înainte de instituirea unui tratament protetic cu caracter de lungă durată în aceste zone. Cu toate acestea, LDF s-a dovedit a fi un instrument util, non-invaziv, sensibil, reproductiv și nedureros pentru măsurarea fluxului sangvin uman la om.

### III. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

**Introducerea tehnicii OCT ar conduce la o simplificare a evaluării periodice a potențialilor subiecți, evitarea biopsiilor inutile, cu reducerea complicațiilor și riscurilor acestor manevre terapeutice invazive.**

Am demonstrat că studii complementare sunt posibile prin combinarea OCT-ului cu metode mai tradiționale, cum ar fi microscopia confocală și micro-CT-ul. În viitorul apropiat, datorită limitărilor atunci când sunt luate în considerare separat, se așteaptă evoluția combinării principiilor. Pentru moment, implementarea combinării principiilor TD și interferometriei SD este încă costisitoare, însă odată implementată, rezultatele obținute prezintă potențial în termeni de obținere a imaginilor *en-face* simultan sau în termeni de extindere a bandei axiale pentru metoda SD. Se pot identifica aplicații de nișă, inițial pentru dispozitivele de scanare de mână iar apoi în catetere axiale lungi ce ar putea fi utilizate în sistemul endodontic. Câteva variante de probe de mână pentru scanarea OCT au fost dezvoltate de grupul nostru, din dorința de a le face cât mai ușoare, simple și ieftine posibil. Am demonstrat că aceste probe se pot construi aproape în întregime din piese universale și că pot avea un design ergonomic. O probă de mână dezvoltată de grupul nostru este deja utilizată într-un studiu *in vivo* într-un mediu clinic. Dezvoltarea probelor de mână face parte din efortul nostru de a extinde investigațiile clinice de la *ex vivo* la *in vivo*.

Am stabilit de asemenea eficiența sistemului VELScope pentru a oferi o delimitare simplă și avantajoasă din punct de vedere al costurilor pentru marginile leziunilor investigate, demonstrându-și totodată capacitatea de a identifica displaziile și leziunile canceroase incipiente. Este util în examinarea clinică, în monitorizarea leziunilor orale și înainte de realizarea biopsiilor. Acest aparat poate **adăuga sensibilitate examinării țesuturilor moi** și poate reprezenta un **adjuvant eficient pentru monitorizarea pacienților cu risc crescut**.

Alterarea expresiei pattern-ului miARN este o descoperire comună în geneza tumorală a CSCO. Câteva miARN-uri alterate, ca și cele identificate în studiul din această teză, par a juca un rol critic în inițierea și progresia CSCO funcționând fie ca oncogene fie ca supresori tumorali. În lumina articolelor publicate anterior și a studiului preliminar din această teză doctorală, putem aprecia că **miARN-urile pot deține un rol important în patogeniza tumorală orală**. Identificarea **biomarkerilor miARN** în probele de salivă reprezintă o **analiză non-invazivă promițătoare** pentru evaluarea riscului la malignitate orală, ce poate adăuga valoare rezultatului histologic.

PET/CT-ul reprezintă o aplicație excepțională pentru stadializarea inițială fiind rezervat de obicei pentru afecțiunile avansate în vederea evaluării metastazelor la distanță și a afecțiunilor recurente și/sau reziduale. Imagistica PET este cel mai bine utilizată în combinație cu examinarea clinică și fizică a unui cadru medical cu experiență. FDG PET/CT prezintă o **acuratețe diagnostică excelentă** pentru depistarea metastazelor la distanță, poate fi utilizat pentru evaluarea răspunsului la tratament și oferă informații valoroase legate de prognosticul pacienților cu cancer al cavității orale. Această tehnică reprezintă astfel o metodă imagistică valoroasă pentru managementul CSCO și pentru prognosticul rezultatelor.

Evaluarea sănătății parodonțiului marginal prin **tehnica LDF** prezentată în această teză doctorală este **simplă și igienică, facilitează reproductibilitatea** iar artefactele sunt minimalizate. LDF s-a dovedit a fi un **instrument util, non-invaziv, sensibil, reproductiv și nedureros** pentru măsurarea fluxului sangvin uman.

Cercetarea pe viitor poate fi direcționată spre stabilirea unor standarde practice clinice pentru examenele de depistare precoce a acestor leziuni. În prezent, **tehnicile vizuale inovative prezentate în această teză doctorală prezintă rezultate promițătoare**, însă nu au încă dovezi științifice pe un număr mare de pacienți și studii multicentrice care să susțină eficiența lor în diagnosticarea precoce a cancerului oral. Utilizarea lor în clinica practică se poate face ca și metodă adjuvantă însă diagnosticul de certitudine va fi obținut prin interpretarea histopatologică a probei biopsice, ce rămâne standardul de aur pentru cancerul oral. **Limitările acestor tehnici**, care constituie un obstacol pentru utilizarea lor pe

scară largă, includ lipsa unor trialuri clinice metodologice de bună calitate, corelarea lor cu alterările histologice și impactul pe care aceste tehnici îl au asupra ratei de supraviețuire a pacientului și a riscului de dezvoltare a bolii recurente.

**Impactul generat** de această teză doctorală se va răsfrânge asupra promovării și dezvoltării cunoașterii științifice în vederea optimizării serviciilor de sănătate pentru cetățenii europeni. De asemenea, va contribui la dezvoltarea cercetării multidisciplinare cu un larg potențial de diseminare a informațiilor. Elaborarea unui protocol diagnostic coerent în acest sens ar duce la reducerea timpului de diagnostic, a numărului de biopsii recoltate, a numărului de rezultate histologice fals negative prin lipsa posibilității de targetare a prelevării de material biptic, dar mai ales ar duce la reducerea numărului de complicații secundare acestor intervenții uneori inutile. Se vor scădea astfel costurile de spitalizare prin reducerea numărului de cazuri cu patologie avansată, și va crește calitatea vieții subiecților prin accesul la tehnici diagnostice de vârf.