

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
IXTH DEPARTMENT – SURGERY I
University Clinic of Otolaryngology**

CIORTAN MIHAELA – IULIANA



PhD THESIS

**PARTICULAR MORPHOPATHOLOGICAL AND
IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS OF
PHARYNGO-LARYNGEAL CANCERS**

Scientific Coordinator
**PROF.HABIL. NICOLAE CONSTANTIN BALICA,
MD, Ph.D.**

Timișoara
2026

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	2
SUMMARY OF THE PhD THESIS	3
1. INTRODUCTION	3
2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	4
3. MOTIVATION, AIM, AND OUTLINE	5
4. PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	7
4.1. A CURRENT OVERVIEW OF TWO OF THE MOST AGGRESSIVE FORMS OF HEAD AND NECK CANCER: PHARYNGEAL CANCER AND LARYNGEAL CANCER	7
4.2. IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE TUMOR IMMUNE MICROENVIRONMENT IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LARYNX AND ITS PROGNOSTIC IMPLICATIONS.....	8
4.3. EVALUATION OF QUERCETIN, MYRICETIN, AND THEIR COMBINATION AS FLAVONOIDS WITH ANTITUMOR POTENTIAL IN HEAD AND NECK CANCER MODELS: AN IN VITRO AND IN OVO STUDY	9
5. GENERAL CONCLUSIONS	10

SUMMARY OF THE PhD THESIS

1. INTRODUCTION

The doctoral thesis entitled ***“Particular Morphopathological and Immunohistochemical Aspects of Pharyngo-Laryngeal Cancers”*** addresses an important topic in head and neck oncology. Pharyngeal and laryngeal cancers are two major groups of malignant tumors of the upper aerodigestive tract, with a strong impact on patient survival, quality of life, and essential functions such as breathing, phonation, swallowing, and nutrition.

These tumors are frequently diagnosed in advanced stages, mainly because early symptoms are often nonspecific, the anatomical location may be difficult to evaluate, and widely implemented screening programs are still lacking. Although modern diagnostic and therapeutic methods have improved, the prognosis remains unfavorable for many patients, especially in advanced, recurrent, or metastatic disease.

In current medical practice, prognosis is still mainly assessed using classical clinical and histopathological parameters, such as tumor site, TNM stage, histological grade, lymph node status, surgical margins, perineural invasion, and lymphovascular invasion. However, patients with apparently similar tumors may have different clinical outcomes. This suggests that classical parameters alone cannot fully explain tumor behavior.

In this context, the evaluation of morphopathological and immunohistochemical features becomes highly relevant. Immunohistochemistry allows a more detailed characterization of tumor biology, especially through the analysis of the tumor immune microenvironment. This microenvironment includes immune cells, stromal cells, cytokines, growth factors, and other elements that interact with tumor cells and may influence tumor progression, recurrence, metastasis, treatment response, and survival.

The thesis integrates three main research directions: a synthesis of current literature on pharyngeal and laryngeal cancers, a morphopathological and immunohistochemical analysis of laryngeal squamous cell carcinoma, and an experimental evaluation of the antitumor potential of two natural

compounds, quercetin and myricetin. Therefore, the thesis follows an integrated approach, moving from clinical and histopathological data to immune profiling and experimental therapeutic perspectives.

2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Pharyngolaryngeal cancers belong to the broader group of head and neck cancers. They arise from the mucosa of the upper aerodigestive tract and include cancers of the pharynx, namely the nasopharynx, oropharynx, and hypopharynx, as well as cancers of the larynx. Although these regions are anatomically close, they have different clinical, histological, therapeutic, and prognostic characteristics.

The most common histological type is squamous cell carcinoma. It develops from the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract and may present keratinizing or non-keratinizing patterns, as well as different degrees of differentiation. In addition to conventional squamous cell carcinoma, rare histological variants may occur, such as basaloid, verrucous, papillary, adenosquamous, spindle cell, or small cell neuroendocrine carcinoma. Recognition of these variants is important because some of them may show more aggressive clinical behavior.

From an epidemiological point of view, pharyngeal and laryngeal cancers are more common in men, especially in individuals with long-term exposure to tobacco and alcohol. Smoking and alcohol consumption are the main modifiable risk factors, and their combined effect is stronger than the effect of each factor alone. Human papillomavirus infection has a particularly important role in oropharyngeal squamous cell carcinoma, especially in HPV-positive tumors, which have distinct biological and prognostic features compared with HPV-negative tumors.

Other risk factors include occupational and environmental exposures, poor diet, poor oral hygiene, microbiome changes, and genetic susceptibility. The concept of field cancerization is also important, because long-term exposure of the upper aerodigestive tract mucosa to carcinogens may favor multifocal lesions or second primary tumors.

Clinically, symptoms depend on tumor location. Laryngeal cancer may present with hoarseness, dysphonia, persistent cough, dysphagia, dyspnea, otalgia, or hemoptysis. Glottic tumors are often diagnosed earlier because they affect the voice at an early stage. In contrast, supraglottic, subglottic, and hypopharyngeal tumors may be diagnosed later because early symptoms are less specific. Pharyngeal cancers may cause dysphagia, odynophagia, weight loss, neck mass, or cervical lymphadenopathy.

Diagnosis is based on ENT examination, endoscopy, biopsy, and imaging investigations. Computed tomography, magnetic resonance imaging, and PET-CT are useful for assessing tumor extension, lymph node involvement, and distant metastases. TNM staging remains essential for treatment planning and prognosis estimation.

Treatment is individualized and discussed by a multidisciplinary team. Therapeutic options include surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy. In early-stage disease, conservative treatments may be used to preserve laryngeal function. In advanced stages, multimodal treatment is often necessary and may significantly affect quality of life. In recent years, immunotherapy, especially PD-1/PD-L1 inhibitors, has become an important option for recurrent or metastatic disease.

The tumor microenvironment has become a central topic in cancer research. In laryngeal squamous cell carcinoma, the immune infiltrate may include T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, mast cells, plasma cells, neutrophils, and eosinophils. These cells may have different roles. Some support antitumor immunity, while others may promote immunosuppression, invasion, and tumor progression. Therefore, analysis of the tumor immune microenvironment may provide additional information beyond classical histopathology.

3. MOTIVATION, AIM, AND OUTLINE

The motivation for this doctoral research was based on the need to better understand the biological and clinical heterogeneity of pharyngolaryngeal cancers. Although tumors may appear similar from a histological point of view, patient outcomes can be very different. This

observation supports the need to identify additional factors that may influence prognosis.

One important direction is represented by the tumor immune microenvironment. In laryngeal squamous cell carcinoma, the distribution of immune cells within the tumor and in the surrounding stroma may reflect the ability of the host immune system to control tumor progression. An active immune infiltrate may be associated with a better prognosis, while an immunosuppressive microenvironment may be linked to poorer outcomes.

At the same time, conventional therapies used in head and neck cancers may produce important adverse effects, such as mucositis, xerostomia, impaired nutrition, swallowing difficulties, and reduced quality of life. For this reason, the investigation of less toxic bioactive compounds with antitumor potential represents a relevant research direction. Quercetin and myricetin, two natural flavonoids with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties, were evaluated in this thesis as part of an experimental translational perspective.

The general aim of the thesis was to evaluate particular morphopathological and immunohistochemical aspects of pharyngolaryngeal cancers, with emphasis on laryngeal squamous cell carcinoma, and to integrate these findings into a clinical, prognostic, and experimental framework.

The objectives were grouped into three main directions.

The first objective was to synthesize current knowledge regarding pharyngeal and laryngeal cancers. This included the analysis of epidemiology, risk factors, clinical manifestations, diagnostic methods, treatment strategies, prognosis, prevention, and unresolved issues.

The second objective was to evaluate the morphopathological and immunohistochemical profile of laryngeal squamous cell carcinoma. For this purpose, a retrospective cohort of patients was analyzed, including classical histopathological parameters and an immunohistochemical panel designed to characterize immune cell populations within the tumor microenvironment.

The third objective was to explore an experimental direction by testing quercetin and myricetin, individually and in combination, on a cell line used in head and neck cancer research. This approach aimed to evaluate cell viability, confluence, morphology, apoptotic-like nuclear changes, migratory capacity, and vascular irritancy potential.

4. PERSONAL CONTRIBUTIONS

4.1. A CURRENT OVERVIEW OF TWO OF THE MOST AGGRESSIVE FORMS OF HEAD AND NECK CANCER: PHARYNGEAL CANCER AND LARYNGEAL CANCER

The first research study was a narrative review that provided a current perspective on pharyngeal and laryngeal cancers. Its role was to establish the theoretical and clinical framework of the thesis.

The study showed that these tumors remain among the most aggressive forms of head and neck cancer. They are frequently diagnosed in advanced stages, have high mortality, and are associated with impairment of essential functions. The main risk factors are smoking, alcohol consumption, and HPV infection, along with diet, occupational exposure, oral hygiene, and genetic susceptibility.

Regarding laryngeal cancer, the study emphasized the importance of tumor location. Glottic tumors are often diagnosed earlier because they cause voice changes, while supraglottic and subglottic tumors may have a more silent evolution and delayed diagnosis. Diagnosis requires clinical examination, laryngoscopy, biopsy, and imaging investigations. Treatment aims to achieve oncological control while preserving laryngeal function whenever possible.

For pharyngeal cancer, nasopharyngeal carcinoma, oropharyngeal squamous cell carcinoma, and hypopharyngeal carcinoma were analyzed separately. Nasopharyngeal carcinoma is strongly associated with Epstein–Barr virus infection, especially in endemic regions. Oropharyngeal carcinoma is strongly associated with HPV infection, particularly HPV-16, and HPV-positive tumors have a distinct biological and prognostic profile. Hypopharyngeal carcinoma is frequently diagnosed in advanced stages and usually has a poor prognosis.

The study also emphasized prevention. Smoking cessation, reduction of alcohol consumption, HPV vaccination, public health education, and early detection are essential for reducing disease burden. At the same time, unresolved issues were highlighted, such as the lack of validated screening

programs for the general population and the uncertain role of HPV in non-
oropharyngeal tumors.

4.2. IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE TUMOR IMMUNE MICROENVIRONMENT IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LARYNX AND ITS PROGNOSTIC IMPLICATIONS

The second study represents the central contribution of the thesis. It evaluated the tumor immune microenvironment in laryngeal squamous cell carcinoma using immunohistochemistry and correlated immune patterns with clinicopathological parameters and patient survival.

The retrospective study included 82 patients diagnosed with laryngeal squamous cell carcinoma. Clinical data, histopathological parameters, and paraffin-embedded tissue samples were analyzed. The evaluated morphopathological parameters included histological grade, keratinization, inflammatory response, perineural and/or lymphovascular invasion, tumor budding, resection margins, and lymph node metastases.

An immunohistochemical panel including p16, CD20, CD3, CD4, CD8, CD68, CD1a, and CD117 was used to characterize the tumor immune microenvironment. These markers allowed the identification and quantification of relevant immune cell populations, such as B lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and mast cells.

Based on the semiquantitative evaluation of the immune infiltrate, cases were classified into three immune patterns: active immune type, mixed type, and immunosuppressive type. The active immune type was characterized by a rich immune infiltrate, with increased density of T and B lymphocytes and dendritic cells. The mixed type showed intermediate and heterogeneous characteristics. The immunosuppressive type was characterized by reduced effector immune cell infiltration and predominance of immunoregulatory components, such as macrophages and mast cells.

The results showed that these immune patterns were associated with patient outcomes. The active immune type was more frequently observed in cases with favorable prognosis, the immunosuppressive type was associated

with reduced overall survival, and the mixed type showed intermediate characteristics. Survival analysis showed clear differences between immunotypes, with 5-year overall survival of 91.7% for immunotype A, 55% for immunotype B, and 12.1% for immunotype C.

This study supports the idea that integrated analysis of the tumor immune microenvironment may provide additional prognostic information beyond classical histopathological parameters. However, the results should be interpreted with caution, because the study was retrospective, included a limited number of cases, and HPV status was not confirmed by molecular methods. Larger prospective multicenter studies are needed to validate this classification.

4.3. EVALUATION OF QUERCETIN, MYRICETIN, AND THEIR COMBINATION AS FLAVONOIDS WITH ANTITUMOR POTENTIAL IN HEAD AND NECK CANCER MODELS: AN IN VITRO AND IN OVO STUDY

The third study had an experimental and translational component. It evaluated the antitumor potential of quercetin and myricetin, two natural flavonoids, using in vitro and in ovo models.

Experiments were performed on the A253 cell line, which is frequently used in head and neck cancer research. Cells were treated with different concentrations of quercetin, myricetin, and their combination. Cell viability, confluence, morphology, nuclear changes, migratory capacity, and vascular irritancy potential were evaluated.

The results showed a dose-dependent decrease in cell viability and confluence after treatment with quercetin, myricetin, and especially their combination. The combined treatment had slightly stronger effects than each compound used individually, especially at higher concentrations. Morphological changes included cell rounding, shrinkage, reduced adhesion, and visible cellular debris.

Hoechst 33342 staining revealed apoptotic-like nuclear changes, such as chromatin condensation and nuclear fragmentation. These changes were

more evident after combined treatment, suggesting a stronger pro-apoptotic effect.

The scratch assay showed that treatments reduced the migratory capacity of A253 cells, especially the QUE + MYR combination at the higher concentration. This result suggests a possible antimigratory effect in a tumor context.

For preliminary safety evaluation, the HET-CAM assay was used. Neither quercetin nor myricetin nor their combination produced signs of vascular irritation on the chorioallantoic membrane. Therefore, the compounds were classified as non-irritant in this experimental model.

The study does not establish a direct therapeutic indication, but it provides important preliminary data. The results support the potential of quercetin and myricetin, especially in combination, as bioactive substances that deserve further investigation in head and neck oncology.

5. GENERAL CONCLUSIONS

The thesis demonstrates that pharyngeal and laryngeal cancers remain aggressive malignancies, with important diagnostic, prognostic, and therapeutic challenges. Late diagnosis, recurrence risk, functional impairment, and the lack of validated screening programs justify the need for further research.

Through the first study, the thesis established the clinical and scientific context of pharyngeal and laryngeal cancers. Through the second study, the importance of the tumor immune microenvironment in laryngeal squamous cell carcinoma was highlighted, and a classification into three immune patterns with prognostic relevance was proposed. Through the third study, an experimental direction was opened regarding the use of natural compounds with antitumor potential.

The main original contribution of the thesis is the integration of classical morphopathological evaluation with immunohistochemical profiling of the tumor microenvironment. This approach may contribute to a better understanding of prognostic heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma and may support the future development of more precise risk stratification strategies.

In conclusion, the thesis contributes to the field of pharyngolaryngeal oncology through a complex approach that combines clinical synthesis, morphopathological analysis, immunohistochemical characterization, prognostic evaluation, and preliminary experimental research. The results support the importance of evaluating not only the tumor itself, but also its immune microenvironment and possible therapeutic vulnerabilities.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL IX – CHIRURGIE I
Clinica Universitară de Otorinolaringologie**

CIORTAN MIHAELA – IULIANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**ASPECTE PARTICULARE MORFOPATOLOGICE ȘI
IMUNOHISTOCHIMICE ALE CANCERELOR
FARINGO-LARINGIENE**

Coordonator Științific
PROF.UNIV.DR. NICOLAE CONSTANTIN BALICA

Timișoara
2026

CUPRINS

CUPRINS	2
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT	3
1. INTRODUCERE	3
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	4
3. MOTIVAȚIE, SCOP ȘI OBIECTIVE	5
4. CONTRIBUȚII PERSONALE	7
4.1. O PERSPECTIVĂ ACTUALĂ ASUPRA A DOUĂ DINTRE CELE MAI AGRESIVE FORME DE CANCER LA NIVELUL CAPULUI ȘI GÂTULUI: CANCERUL FARINGIAN ȘI CANCERUL LARINGIAN	7
4.2. STUDIU IMUNOHISTOCHIMIC AL MICROMEDIULUI IMUN TUMORAL ÎN CARCINOMUL CU CELULE SQUAMOASE AL LARINGELUI ȘI IMPLICAȚIILE SALE PROGNOSTICE	8
4.3. EVALUAREA QUERCETINEI, A MYRICETINEI ȘI A COMBINAȚIEI LOR CA FLAVONOIDE CU POTENȚIAL ANTITUMORAL ÎN MODELE DE CANCER LA NIVELUL CAPULUI ȘI GÂTULUI: UN STUDIU IN VITRO ȘI IN OVO	9
5. CONCLUZII GENERALE	10

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Teza de doctorat intitulată „**Aspecte particulare morfopatologice și imunohistochimice ale cancerelor faringo-laringiene**” abordează un subiect de mare importanță pentru oncologia capului și gâtului. Canceralele faringiene și laringiene reprezintă două categorii importante de tumori maligne ale tractului aerodigestiv superior, cu impact major asupra supraviețuirii pacienților, calității vieții și funcțiilor esențiale precum respirația, fonația, deglutiția și alimentația. Aceste tumori sunt frecvent diagnosticate în stadii avansate, mai ales din cauza simptomelor inițiale nespecifice, localizării anatomice profunde și lipsei unor programe de screening aplicate pe scară largă. Deși metodele moderne de diagnostic și tratament au evoluat considerabil, prognosticul multor pacienți rămâne nefavorabil, în special în cazurile avansate, recidivante sau metastatice.

În practica medicală curentă, evaluarea prognosticului se bazează încă în mare măsură pe parametri clinici și histopatologici clasici, precum localizarea tumorii, stadiul TNM, gradul histologic, statusul ganglionilor limfatici, marginile chirurgicale, invazia perineurală și invazia limfovasculară. Totuși, pacienții cu tumori aparent asemănătoare pot avea evoluții clinice diferite. Acest lucru sugerează că parametrii clasici nu pot explica în totalitate comportamentul tumoral.

În acest context, evaluarea caracteristicilor morfopatologice și imunohistochimice devine deosebit de importantă. Imunohistochimia permite o caracterizare mai detaliată a biologiei tumorale, în special prin analiza micromediului imun tumoral. Acesta include celule imune, celule stromale, citokine, factori de creștere și alte componente care interacționează cu celulele tumorale și pot influența progresia tumorii, recidiva, metastazarea, răspunsul la tratament și supraviețuirea.

Teza integrează trei direcții principale de cercetare: sinteza datelor actuale din literatură privind canceralele faringiene și laringiene, analiza morfopatologică și imunohistochimică a carcinomului scuamos laringian și evaluarea experimentală a potențialului antitumoral al unor compuși naturali,

quercetina și miricetina. Astfel, lucrarea urmărește o abordare integrată, de la date clinice și histopatologice până la profilarea imună și perspective terapeutice experimentale.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerale faringo-laringiene fac parte din categoria mai largă a cancerelor capului și gâtului. Ele se dezvoltă la nivelul mucoasei tractului aerodigestiv superior și includ tumorile faringelui, respectiv nazofaringe, orofaringe și hipofaringe, precum și tumorile laringelui. Deși aceste regiuni sunt apropiate anatomic, ele au particularități clinice, histologice, terapeutice și prognostice diferite. Cel mai frecvent tip histologic este carcinomul scuamos. Acesta apare din epiteliul scuamos al tractului aerodigestiv superior și poate prezenta forme cheratinizante sau necheratinizante, precum și diferite grade de diferențiere. Pe lângă carcinomul scuamos convențional, pot apărea și variante histologice mai rare, precum carcinomul scuamos bazaloid, verucos, papilar, adenoscuamos, cu celule fusiforme sau neuroendocrin cu celule mici. Recunoașterea acestor variante este importantă, deoarece unele pot avea un comportament clinic mai agresiv.

Epidemiologic, cancerale faringiene și laringiene sunt mai frecvente la bărbați, mai ales la persoanele cu expunere îndelungată la tutun și alcool. Fumatul și consumul de alcool reprezintă principalii factori de risc modificabili, iar efectul lor combinat este mai puternic decât efectul fiecăruia luat separat. Infecția cu virusul papiloma uman are un rol deosebit de important în carcinomul scuamos orofaringian, mai ales în tumorile HPV-pozitive, care au particularități biologice și prognostice diferite față de tumorile HPV-negative.

Alți factori de risc includ expunerile profesionale și de mediu, alimentația deficitară, igiena orală precară, modificările microbiomului și susceptibilitatea genetică. Conceptul de cancerizare în câmp este important în aceste tumori, deoarece expunerea prelungită a mucoasei tractului aerodigestiv superior la factori carcinogeni poate favoriza apariția unor leziuni multifocale sau a unor tumori primare secundare.

Din punct de vedere clinic, manifestările depind de localizarea tumorii. Cancerul laringian se poate manifesta prin răgușeală, disfonie, tuse persistentă, disfagie, dispnee, otalgie sau hemoptizie. Tumorile glotice sunt

adesea diagnosticate mai devreme, deoarece afectează rapid vocea. În schimb, tumorile supraglotice, subglotice și hipofaringiene pot fi diagnosticate tardiv, deoarece simptomele inițiale sunt mai puțin specifice. Cancerele faringiene pot produce disfagie, odinofagie, scădere ponderală, masă cervicală sau limfadenopatie cervicală.

Diagnosticul se bazează pe examen clinic ORL, endoscopie, biopsie și investigații imagistice. Tomografia computerizată, imagistica prin rezonanță magnetică și PET-CT sunt utile pentru evaluarea extensiei tumorale, afectării ganglionare și metastazelor la distanță. Stadializarea TNM rămâne esențială pentru planificarea tratamentului și estimarea prognosticului.

Tratamentul este individualizat și stabilit în cadrul unei echipe multidisciplinare. Opțiunile includ chirurgia, radioterapia, chimioterapia, terapia țintită și imunoterapia. În stadiile incipiente se pot utiliza tratamente conservatoare, cu scopul de a păstra funcția laringiană. În stadiile avansate sunt frecvent necesare terapii multimodale, care pot avea un impact semnificativ asupra calității vieții. În ultimii ani, imunoterapia, în special inhibitorii PD-1/PD-L1, a devenit o direcție importantă pentru boala recurentă sau metastatică.

Micromediul tumoral a devenit o temă centrală în cercetarea oncologică. În carcinomul scuamos laringian, infiltratul imun poate include limfocite T, limfocite B, macrofage, celule dendritice, mastocite, plasmocite, neutrofile și eozinofile. Aceste celule pot avea roluri diferite, unele susținând răspunsul antitumoral, iar altele favorizând imunosupresia, invazia și progresia tumorală. De aceea, analiza micromediului imun tumoral poate oferi informații suplimentare față de histopatologia clasică.

3. MOTIVAȚIE, SCOP ȘI OBIECTIVE

Motivația acestei cercetări a pornit de la necesitatea de a înțelege mai bine heterogenitatea biologică și clinică a cancerelor faringo-laringiene. Deși tumorile pot părea similare din punct de vedere histologic, evoluția pacienților poate fi foarte diferită. Această observație susține necesitatea identificării unor factori suplimentari care pot influența prognosticul.

O direcție importantă este reprezentată de micromediul imun tumoral. În carcinomul scuamos laringian, modul în care celulele imune sunt distribuite în interiorul tumorii și în stroma tumorală poate reflecta capacitatea organismului de a controla progresia tumorală. Un infiltrat imun activ poate fi asociat cu un prognostic mai bun, în timp ce un micromediu imunosupresiv poate fi legat de o evoluție mai nefavorabilă.

În același timp, terapiile convenționale utilizate în cancerele capului și gâtului pot produce efecte adverse importante, precum mucozită, xerostomie, afectarea nutriției, tulburări de deglutiție și deteriorarea calității vieții. Din acest motiv, cercetarea unor compuși bioactivi mai puțin toxici, cu potențial antitumoral, reprezintă o direcție relevantă. Quercetina și miricetina, doi flavonoizi naturali cu proprietăți antioxidante, antiinflamatorii și antitumorale, au fost evaluate în această teză ca parte a unei perspective experimentale translaționale.

Scopul general al tezei a fost evaluarea aspectelor morfopatologice și imunohistochimice particulare ale cancerelor faringo-laringiene, cu accent pe carcinomul scuamos laringian, precum și integrarea acestor date într-un cadru clinic, prognostic și experimental.

Obiectivele cercetării au fost grupate în trei direcții principale.

Primul obiectiv a fost sintetizarea cunoștințelor actuale privind cancerele faringiene și laringiene. Această direcție a inclus analiza epidemiologiei, a factorilor de risc, a manifestărilor clinice, a metodelor de diagnostic, a strategiilor terapeutice, a prognosticului, a prevenției și a problemelor încă nerezolvate.

Al doilea obiectiv a fost evaluarea profilului morfopatologic și imunohistochimic al carcinomului scuamos laringian. În acest scop, a fost analizată o cohortă retrospectivă de pacienți, cu evaluarea parametrilor histopatologici clasici și a unui panel imunohistochimic destinat caracterizării populațiilor de celule imune din micromediul tumoral.

Al treilea obiectiv a fost explorarea unei direcții experimentale prin testarea quercetinei și miricetinei, individual și în combinație, pe o linie celulară utilizată în cercetarea cancerelor capului și gâtului. Prin această abordare s-a urmărit evaluarea viabilității celulare, confluenței, morfologiei, modificărilor nucleare de tip apoptotic, capacității de migrare și potențialului iritant vascular.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. O PERSPECTIVĂ ACTUALĂ ASUPRA A DOUĂ DINTRE CELE MAI AGRESIVE FORME DE CANCER LA NIVELUL CAPULUI ȘI GÂTULUI: CANCERUL FARINGIAN ȘI CANCERUL LARINGIAN

Primul studiu de cercetare a fost un review narativ care a oferit o perspectivă actuală asupra cancerelor faringiene și laringiene. Acesta a avut rolul de a crea cadrul teoretic și clinic al tezei.

Studiul a evidențiat faptul că aceste tumori rămân printre cele mai agresive forme de cancer ale capului și gâtului. Ele sunt frecvent diagnosticate în stadii avansate, au o mortalitate ridicată și sunt asociate cu afectarea unor funcții esențiale. Factorii de risc principali sunt fumatul, consumul de alcool și infecția cu HPV, la care se adaugă dieta, expunerile profesionale, igiena orală și susceptibilitatea genetică.

În ceea ce privește cancerul laringian, studiul a subliniat importanța localizării tumorale. Tumorile glotice sunt adesea diagnosticate mai devreme datorită modificărilor vocii, în timp ce tumorile supraglotice și subglotice pot avea o evoluție mai silențioasă și un diagnostic mai tardiv. Diagnosticul necesită evaluare clinică, laringoscopie, biopsie și investigații imagistice. Tratamentul urmărește controlul oncologic, dar și conservarea funcției laringiene atunci când este posibil.

În cazul cancerului faringian, au fost analizate separat carcinomul nazofaringian, carcinomul scuamos orofaringian și carcinomul hipofaringian. Carcinomul nazofaringian este strâns legat de infecția cu virusul Epstein-Barr, mai ales în regiunile endemice. Carcinomul orofaringian este puternic asociat cu infecția HPV, în special HPV-16, iar tumorile HPV-pozitive au un profil biologic și prognostic distinct. Carcinomul hipofaringian este frecvent diagnosticat în stadii avansate și are un prognostic mai nefavorabil.

Studiul a pus accent și pe prevenție. Renunțarea la fumat, reducerea consumului de alcool, vaccinarea HPV, educația pentru sănătate și depistarea precoce sunt esențiale pentru reducerea poverii acestor boli. Totodată, au fost evidențiate probleme nerezolvate, precum lipsa unor programe de screening validate pentru populația generală și rolul incert al HPV în tumorile non-orofaringiene.

4.2. STUDIU IMUNOHISTOCHIMIC AL MICROMEDIULUI IMUN TUMORAL ÎN CARCINOMUL CU CELULE SQUAMOASE AL LARINGELUI ȘI IMPLICAȚIILE SALE PROGNOSTICE

Al doilea studiu de cercetare reprezintă contribuția centrală a tezei. Acesta a evaluat micromediul imun tumoral în carcinomul scuamos laringian prin imunohistochimie și a corelat modelele imune cu parametrii clinicopatologici și supraviețuirea pacienților.

Studiul retrospectiv a inclus 82 de pacienți diagnosticați cu carcinom scuamos laringian. Au fost analizate date clinice, parametri histopatologici și probe incluse în parafină. Parametrii morfopatologici evaluați au inclus gradul histologic, cheratinizarea, răspunsul inflamator, invazia perineurală și/sau limfovasculară, tumor budding, marginile de rezeecție și metastazele ganglionare.

Pentru caracterizarea micromediului imun tumoral a fost utilizat un panel imunohistochimic care a inclus p16, CD20, CD3, CD4, CD8, CD68, CD1a și CD117. Acești markeri au permis identificarea și cuantificarea unor populații celulare relevante, precum limfocitele B, limfocitele T, limfocitele T helper, limfocitele T citotoxice, macrofagele, celulele dendritice și mastocitele.

Pe baza evaluării semicantitative a infiltratului imun, cazurile au fost clasificate în trei modele imune: tip imun activ, tip mixt și tip imunosupresiv. Tipul imun activ a fost caracterizat printr-un infiltrat imun bogat, cu densitate crescută de limfocite T și B și celule dendritice. Tipul mixt a prezentat caracteristici intermediare și heterogene. Tipul imunosupresiv a fost caracterizat prin infiltrat redus de celule efectoare și predominanța unor componente imunoreglatoare, precum macrofagele și mastocitele.

Rezultatele au arătat că aceste modele imune sunt asociate cu evoluția pacienților. Tipul imun activ a fost observat mai frecvent în cazurile cu prognostic favorabil, tipul imunosupresiv a fost asociat cu supraviețuire globală redusă, iar tipul mixt a avut caracteristici intermediare. Analiza supraviețuirii a arătat diferențe clare între imunotipuri, supraviețuirea globală la 5 ani fiind de 91,7% pentru imunotipul A, 55% pentru imunotipul B și 12,1% pentru imunotipul C.

Acest studiu susține ideea că analiza integrată a micromediului imun tumoral poate oferi informații suplimentare față de parametrii histopatologici

clasici. Totuși, rezultatele trebuie interpretate cu prudență, deoarece studiul a fost retrospectiv, a inclus un număr limitat de cazuri, iar statusul HPV nu a fost confirmat prin metode moleculare. Sunt necesare studii prospective, multicentrice, pentru validarea acestei clasificări.

4.3. EVALUAREA QUERCETINEI, A MYRICETINEI ȘI A COMBINAȚIEI LOR CA FLAVONOIDE CU POTENȚIAL ANTITUMORAL ÎN MODELE DE CANCER LA NIVELUL CAPULUI ȘI GÂTULUI: UN STUDIU IN VITRO ȘI IN OVO

Al treilea studiu de cercetare a avut o componentă experimentală și translațională. Acesta a evaluat potențialul antitumoral al quercetinei și miricetinei, două flavonoide naturale, folosind modele in vitro și in ovo.

Experimentele au fost realizate pe linia celulară A253, utilizată frecvent în cercetarea cancerelor capului și gâtului. Celulele au fost tratate cu diferite concentrații de quercetină, miricetină și combinația acestora. Au fost evaluate viabilitatea celulară, confluența, morfologia, modificările nucleare, capacitatea de migrare și potențialul iritant vascular.

Rezultatele au arătat o scădere dependentă de doză a viabilității și confluenței celulare după tratamentul cu quercetină, miricetină și, mai ales, combinația acestora. Tratamentul combinat a avut efecte ușor mai puternice decât fiecare compus utilizat individual, în special la concentrații mai mari. Modificările morfologice au inclus rotunjirea celulelor, micșorarea acestora, reducerea aderenței și apariția unor resturi celulare.

Colorarea cu Hoechst 33342 a evidențiat modificări nucleare de tip apoptotic, precum condensarea cromatinei și fragmentarea nucleară. Aceste modificări au fost mai evidente în cazul tratamentului combinat, sugerând un efect pro-apoptotic mai accentuat.

Testul scratch a arătat că tratamentele au redus capacitatea de migrare a celulelor A253, mai ales în cazul combinației QUE + MYR la concentrația mai mare. Acest rezultat sugerează un posibil efect antimigrator în context tumoral.

Pentru evaluarea siguranței preliminare, a fost utilizat testul HET-CAM. Nici quercetina, nici miricetina și nici combinația lor nu au produs semne de

iritație vasculară pe membrana corioalantoidiană. Astfel, compușii au fost clasificați ca neiritanți în acest model experimental.

Studiul nu stabilește o indicație terapeutică directă, dar oferă date preliminare importante. Rezultatele susțin potențialul quercetinei și miricetinei, în special în combinație, ca substanțe bioactive care merită a fi investigate în continuare în oncologia capului și gâtului.

5. CONCLUZII GENERALE

Teza demonstrează că tumorile faringiene și laringiene rămân afecțiuni maligne agresive, cu provocări importante legate de diagnostic, prognostic și tratament. Diagnosticul tardiv, riscul de recidivă, afectarea funcțională și lipsa unor programe de screening validate justifică necesitatea unor cercetări suplimentare.

Prin primul studiu, teza a stabilit contextul clinic și științific al cancerelor faringiene și laringiene. Prin al doilea studiu, a fost evidențiată importanța micromediului imun tumoral în carcinomul scuamos laringian, propunându-se o clasificare în trei modele imune cu relevanță prognostică. Prin al treilea studiu, a fost deschisă o direcție experimentală privind utilizarea unor compuși naturali cu potențial antitumoral.

Principală contribuție originală a tezei este integrarea evaluării morfopatologice clasice cu profilarea imunohistochimică a micromediului tumoral. Această abordare poate contribui la o mai bună înțelegere a heterogenității prognostice în carcinomul scuamos laringian și poate susține, în viitor, dezvoltarea unor strategii de stratificare a riscului mai precise.

În concluzie, teza contribuie la domeniul oncologiei faringo-laringiene printr-o abordare complexă, care îmbină sinteza clinică, analiza morfopatologică, caracterizarea imunohistochimică, evaluarea prognostică și cercetarea experimentală preliminară. Rezultatele obținute susțin importanța evaluării nu doar a tumorii în sine, ci și a micromediului său imun și a posibilelor vulnerabilități terapeutice.