

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

2026

Entități clinic morfologice și biomoleculare ale carcinomului cervical

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat : **Prof. Univ. Dr. Așchie Mariana**

Doctorand : **Petrica Laura-Andra**

Comisie de îndrumare:

Conf. Univ. Dr. Deacu Mariana

CS I Dr. Cozaru Georgeta Camelia

CS I Dr. Mitroi Anca Florentina

LISTĂ PUBLICAȚII

1. Lucian Șerbănescu; Sebastian Mirea; Paris Ionescu; **Laura-Andra Petrica**; Ionut Ciprian Iorga; Monica Surdu; Traian Virgiliu Surdu; Vadym Rotar. Involuntary Urine Loss In Menopause – A Narrative Review. *J. Clin. Med.* 2025, 14(21), 7664. ISSN: 2077-0383. ISI (Factor de Impact 2,9). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41227060/>. doi: [10.3390/jcm14217664](https://doi.org/10.3390/jcm14217664)
2. **Laura-Andra Petrica**; Mariana Deacu; Georgeta Camelia Cozaru; Anca Florentina Mitroi; Gabriela Izabela Bălțătescu; Manuela Enciu; Oana Cojocaru; Anca-Antonela Nicolau; Andrei Radu Baz; Lucian Șerbănescu; Mariana Așchie. Interplay Between Immune Microenvironment CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes And PDL-1 Expression as Prognostic Markers in Invasive Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Medicina.* 2025, 61(11), 2007. ISSN: 1648-9144. ISI (Factor de Impact 2,4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41303843/>. doi: [10.3390/reports8040243](https://doi.org/10.3390/reports8040243)
3. **Laura-Andra Petrica**; Mariana Deacu; Georgeta Camelia Cozaru; Gabriela Izabela Bălțătescu; Mariana Așchie. Clinically Advanced Warty Invasive Squamous Cell Carcinoma of the Cervix with p16 Overexpression—Case Study and Literature Review. *Reports.* 2025; 8(4):243. ISSN: 2571-841X (Online). ISI (Factor de Impact 0,6). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41283611/>. doi: [10.3390/reports8040243](https://doi.org/10.3390/reports8040243)

CUPRINS

ABREVIERI	15
INTRODUCERE	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. STRUCTURA ȘI DEZVOLTAREA CERVIXULUI	23
1.1. SCURTĂ PREZENTARE ANATOMICĂ A CERVIXULUI	23
1.2. MICROSCOPIA CERVIXULUI	24
1.3. ETAPELE DEZVOLTĂRII CERVIXULUI	29
1.3.1. ETAPA DEZVOLTĂRII EMBRIO-FETALE	29
1.3.2. ETAPA DEZVOLTĂRII PREPUBERTALE	30
1.3.3. ETAPA DEZVOLTĂRII POSTPUBERTALE	30
1.3.4. ETAPA DEZVOLTĂRII ÎN CURSUL SARCINII	31
1.3.5. ETAPA DEZVOLTĂRII ÎN CURSUL MENOPAUZEI	32
2. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA CARCINOMULUI CERVICAL	33
2.1. FACTORI DE RISC	36
2.2. ASPECTE CLINICE ȘI PARACLINICE	36
2.3. EVALUAREA DIAGNOSTICĂ	37
2.4. STADIALIZARE	41
2.5. TRATAMENT	46
3. ASPECTE MORFOPATOLOGICE ȘI IMUNOHISTOCHIMICE ALE CARCINOMULUI CERVICAL	49
3.1. CLASIFICAREA OMS A CARCINOMULUI CERVICAL	49
3.2. GRADAREA CARCINOAMELOR CERVICALE	51
3.2.1. GRADAREA CARCINOMULUI SCUAMOCELULAR	51
3.2.2. GRADAREA ADENOCARCINOMULUI CERVICAL HPV-ASOCIAT	52
3.3. ASPECTE MORFOPATOLOGICE ALE CARCINOMULUI CERVICAL	53
3.3.1. ASPECTE MACROSCOPICE ALE CARCINOMULUI CERVICAL	53
3.3.2. ASPECTE MICROSCOPICE ALE CARCINOMULUI CERVICAL	55
3.4. MARKERI IMUNOHISTOCHIMICI	62
3.4.1. KI-67	62
3.4.2. P53	62
3.4.3. PDL-1	64
4. MICROMEDIUL TUMORAL	65
4.1. INFILTRATUL TUMORAL LIMFOCITAR	66
4.1.1. CD8	67
4.2. NEOANGIOGENEZĂ	68
4.2.1. CD34	69
4.2.2. CD105 (endoglină)	70
5. CARCINOMUL CERVICAL ÎN CADRUL INTELIGENȚEI ARTIFICIALE ȘI PATOLOGIEI DIGITALE	73
CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	83
6. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	85
6.1. MOTIVAȚIA STUDIULUI	85
6.2. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	87
7. MATERIAL ȘI METODĂ	89
7.1. SELECȚIA CAZURILOR	89

7.2. METODE DE LUCRU	90
8. EVALUAREA INTEGRATIVĂ A PARAMETRIILOR CLINICO-BIOLOGICI ȘI A CARACTERISTICILOR HISTOPATOLOGICE ȘI PROTEOMICE A CAZURILOR DE CARCINOM CERVICAL INCLUSE ÎN STUDIU	101
8.1. INTRODUCERE	101
8.2. IPOTEZĂ DE LUCRU	101
8.3. MATERIAL ȘI METODĂ	102
8.4. REZULTATE	109
8.4.1. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA LOTULUI DE STUDIU	109
8.4.2. EVALUAREA EXPRESIEI MARKERULUI IMUNOHISTOCHIMIC KI67	127
8.4.3. EVALUAREA EXPRESIEI MARKERULUI IMUNOHISTOCHIMIC P53	133
8.5. DISCUȚII	139
8.5.1. DISCUȚII ASUPRA CONSIDERAȚIILOR GENERALE ALE LOTULUI DE STUDIU	139
8.5.2. DISCUȚII ASUPRA EXPRESIEI MARKERULUI IMUNOHISTOCHIMIC KI67	155
8.5.3. DISCUȚII ASUPRA EXPRESIEI MARKERULUI IMUNOHISTOCHIMIC P53	162
8.6. CONCLUZII	170
9. CARACTERIZAREA DISTRIBUȚIEI INFILTRATULUI TUMORAL LIMFOCITAR (TILs) ÎN CONJUNCȚIE CU ANALIZA DISTRIBUȚIEI ȘI EXPRESIEI CELULELOR CD8⁺TILs DIN MICROMEDIUL TUMORAL ÎN VEDEREA EVALUĂRII ROLULUI IMUNOLOGIC ȘI PROGNOSTIC AL ACESTORA	173
9.1. INTRODUCERE	173
9.2. IPOTEZĂ DE LUCRU	173
9.3. MATERIAL ȘI METODĂ	174
9.4. REZULTATE	178
9.5. DISCUȚII	190
9.6. CONCLUZII	199
10. EVALUAREA NEOANGIOGENEZEI DIN MICROMEDIUL CANCERULUI CERVICAL PRIN ANALIZA DENSITĂȚII VASCULARE CU AJUTORUL EXPRESIEI IMUNOHISTOCHIMICE A BIOMARKERILOR CD34 ȘI CD105 (ENDOGLINĂ) ȘI CORELAȚIA ACESTEIA CU PARAMETRI CLINICO-PATOLOGICI	201
10.1. INTRODUCERE	201
10.2. IPOTEZĂ DE LUCRU	201
10.3. MATERIAL ȘI METODĂ	202
10.4. REZULTATE	208
10.4.1. DENSITATEA MICROVASCULARĂ ȘI PARAMETRI DEMOGRAFICI, CLINICO-MORFOLOGICI ȘI IMUNOHISTOCHIMICI CU RELEVANȚĂ PROGNOSTICĂ SAU PREDICTIVĂ	208
10.4.2. ROLUL BIOMARKERILOR CD34 ȘI CD105 ÎN STRATIFICAREA RISCULUI LA PACIENTELE CU CANCER CERVICAL DE ORIGINE EPITELIALĂ	219
10.5. DISCUȚII	220
10.5.1. CD34	224
10.5.2. CD105 (ENDOGLINĂ)	229
10.6. CONCLUZII	234
11. EVALUAREA EXPRESIEI IMUNOHISTOCHIMICE A BIOMARKERULUI PD-L1 ÎN CANCERUL CERVICAL ȘI ANALIZA CORELAȚIILOR ACESTUIA CU PARAMETRII IMUNOLOGICI ȘI NEOANGIOGENICI DIN MICROMEDIUL TUMORAL, ÎN VEDEREA ÎNȚELEGERII ROLULUI IMUNOEVAZIV ȘI A POTENȚIALULUI ROL PROGNOSTIC TERAPEUTIC	237
11.1. INTRODUCERE	237
11.2. IPOTEZĂ DE LUCRU	237
11.3. MATERIAL ȘI METODĂ	238

11.4. REZULTATE	240
11.5 DISCUȚII	253
11.6. CONCLUZII	266
12. CONCLUZII GENERALE	269
13. ORIGINALITATEA TEZEI	273
REFERINȚE	275
ANEXE	345

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. STRUCTURA ȘI DEZVOLTAREA CERVIXULUI

Uterul este un organ cavitătar, cu perete gros și contractil, ce are rolul să găzduiască celula ou în timpul stadiilor evolutive ale acesteia și să expulzeze fătul în momentul când și-a încheiat dezvoltarea. Uterul este un organ median, nepereche, format din corpul uterin și colul uterin care se mai numește și cervix [1,2].

Cervixul (colul uterin) are formă de butoiăș cilindric și prezintă două orificii/ostiumuri, intern și extern. Cel extern la nulipare este punctiform, iar la multipare are aspectul unei fante transversale. Între cele două orificii se delimitează canalul cervical (în clinică, endocolul). Vaginul se inseră la nivelul cervixului pe o linie oblică, cu orientare supero-inferioară și postero-anterioară; astfel inserția vaginului va delimita cervixul în două porțiuni: supravaginală și intravaginală. Orificiul extern cervical este mărginit de două buze: anterioară și posterioară, unite prin două comisuri laterale. Dimensiunile cervicale sunt de aproximativ 3 centimetri lungime și 2 centimetri lățime, iar consistența acestuia este fermă. Axul cervixului este dispus oblic dinspre anterosuperior spre posteroinferior [1,2].

Configurația internă a cervixului constă dintr-un strat muscular mult mai slab dezvoltat comparativ cu cel al corpului uterin și un strat mucos format din două tipuri de țesut epitelial: cilindric monostratificat și pavimentos nekeratinizat pluristratificat. Tranziția dintre cele două tipuri de țesut epitelial se numește zonă de transformare sau joncțiune scuamocilindrică. [1]

Acești parametri variază în funcție de factori constituționali, paritate, vârstă, starea fiziologică sau patologia supraadăugată.

După cum am precizat mai sus cervixul prezintă două porțiuni: exocervixul (după unii autori, ectocervix) și endocervixul (după unii autori, endocolul).

În mod normal, *exocervixul* este acoperit de epiteliu scuamos (pavimentos) nekeratinizat pluristratificat. Grosimea epiteliului este influențată de cantitatea de hormoni disponibili (din producția endogenă sau aportul exogen) și variază în funcție de vârstă și stimularea hormonală.

În cursul vieții reproductive, epiteliul este gros și bine diferențiat. Acesta constă din:

- stratul bazal cu celule ce au nucleu voluminos cu cromatină densă și citoplasmă puțină; aceste celule sunt, de obicei, inactive mitotic și nu exprimă la imunohistochemiemarkerii de proliferare Ki-67 și PCNA [3-6].

- stratul parabazal format din celule puțin mai voluminoase comparativ cu cele bazale datorită cantității mai mari de citoplasmă și cu nucleu cu cromatină mai puțin densă; la acest nivel mitozele sunt de obicei prezente, dar nu sunt anormale sau numeroase în epiteliul normal; celulele din acest strat exprimă markeri de proliferare [3-6];

- stratul intermediar format din celule cu nucleu mai mic și citoplasmă mai multă care conține glicogen din abundență [3-6];

- stratul superficial care conține celule mature, necheratinizate și celulele pot conține granule cheratohialine; nucleii acestor celule sunt mici, picnotici, iar citoplasma abundentă; celulele din acest strat sunt considerate mature și sunt cele care se exfoliază [3-6].

În cursul procesului de maturizare celulele își modifică forma (devin din ce în ce mai aplatizate), nucleu devine mai mic, iar citoplasma mai abundentă.

Prin tehnici imunohistochimice, celule endocrine, au fost identificate în epiteliul scuamos al exocervixului. Funcția lor este necunoscută, dar se pare că acestea dau naștere tumorilor cervicale carcinoide rare [6-13].

De asemenea, celule Langerhans sunt prezente în epiteliul exocervical, precum și în zona de transformare. Acesta sunt implicate în prezentarea antigenelor către limfocitele T [14-16]. Celule ce conțin melanină au fost identificate în epiteliul cervical, iar acestea oferă o explicație plauzibilă a originii melanoamelor cervicale și nevilor albaștri (ambele entități rare la acest nivel) [17]. Epiteliul exocervixului este așezat pe o membrană bazală care îl separă de stroma subiacentă.

Endocervixul anatomic se extinde de la nivelul orificiului cervical extern până la cel intern, dar epiteliul glandular endocervical nu este exclusiv limitat la regiunea anatomică menționată mai sus. Epiteliul endocervical ocupă regiuni semnificative ale exocervixului anatomic în timpul copilăriei și după menarhă. Endocervixul este format dintr-un singur strat de celule epiteliale cilindrice, înalte, cu nucleu mici, bazilari deasupra cărora se află citoplasmă ce conține mucină. Nuclei sunt mici, elongați și prezintă

cromatină densă. Atunci când epiteliul endocervical a fost lezat și se regenerează, nucleii pot deveni mai mari și mai rotunzi, dar mitozele sunt rar observate în celulele endocervicale nonneoplastice. Nucleolii nu sunt de obicei proeminenți la nivelul celulelor endocervicale în repaus, dar pot deveni astfel în cadrul proceselor de regenerare, sarcină și transformare neoplazică. Celulele de rezervă subiacente au potențialul de a se diferenția în celule ciliate sau celule mucus secretante, deși celulele mucoase diferențiate au capacitatea de diviziune fără intervenția celulelor de rezervă. Celule endocrine sunt prezente în cadrul epiteliului endocervical [3-6]. Funcția lor este neclară, dar se consideră că acestea dau naștere neoplasmelor endocrine precum carcinoidele sau carcinoamele neuroendocrine care sunt ocazional descoperite la nivel cervical [7,11].

Joncțiunea scuamocelulară (JSC) a cervixului este definită ca granița dintre epiteliul scuamos necheratinizat stratificat și epiteliul cilindric muco-secretant al endocervixului. Sunt descrise două tipuri de joncțiune scuamocelulară

- joncțiunea scuamocelulară originală – locul unde epiteliul scuamos nativ și cel cilindric mucosecretant se întâlnesc; acesta este prezentă de la naștere; localizarea exactă a sa prezintă variații individuale și în funcție de momentul dezvoltării din cadrul vieții;

- joncțiunea scuamocelulară nouă – locul unde zona de metaplazie se întâlnește cu epiteliul cilindric mucosecretant. Aceasta este un reper important și este relevantă pentru evaluarea adecvată a zonei de transformare.

2. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA CARCINOMULUI CERVICAL

Cancerul cervical (CC) se situează pe locul al patrulea în lume în ceea ce privește morbiditatea și mortalitatea în rândul femeilor, conform datelor Agenției Internaționale de Cercetare în domeniul cancerului (IARC - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory) [18]. În anul 2020, la nivel mondial, s-au înregistrat peste 600.000 de cazuri noi (~6.5% din toate cancerurile) și 342.000 de decese (7,5%) [18,19]. Aceasta este cel mai frecventă patologie malignă diagnosticată în 23 de țări și principala cauză de mortalitate datorată cancerului în 36 de țări [20,21].

Mortalitatea cauzată de cancerul cervical este inegal distribuită, variind de la 5,2 decese la 100.000 de persoane în țările înalt dezvoltate la 12,4 decese la 100.000 în țările mai puțin dezvoltate [22]. Datele statistice evidențiază în mod cert faptul că atât incidența,

cât și mortalitatea determinată de cancerul cervical variază în funcție de venituri. Astfel, în țările cu venituri mici și medii incidența sa este aproape de două ori mai mare, iar ratele mortalității de trei ori mai mari decât în țările cu venituri mari.

Conform Globocan, în 2020, în România cancerul cervical a ocupat locul trei în cadrul cancerelor nou diagnosticate în cadrul populației feminine (după cancerul mamar și colorectal) [23]. O comparație interesantă se poate face între România și Marea Britanie care este o țară cu program de screening funcțional – incidența cancerului cervical în populația generală în România este de 3,4% cu mortalitate de 3,3%, iar în Marea Britanie de 0,83% cu mortalitate de 0,62% [23,24]. În anul 2022, în România, incidența cancerului de col uterin ocupa a treia poziție după cancerul de sân și colo-rectal, și a patra poziție ca mortalitate după cancerul de sân, colo-rectal și pulmonar) [25].

Conform unui buletin eliberat de INSP care evaluează mortalitatea generală în cadrul populației în anul 2023, cancerul cervical reprezintă a treia cauză de deces în cadrul populației feminine, după cancerul aparatului respirator și cel mamar. De asemenea, în același buletin este precizată scăderea numărului de decese cauzate de cancerul cervical în 2023, față de 2022. În 2022 cancerul cervical a cauzat 1290 de decese corespunzător la 5.9 decese la 100000 de locuitori, în timp ce în 2023 cancerul cervical a cauzat 1177 de decese corespunzător la 5,4 decese la 100000 de locuitori [25].

Cancerul cervical este o boală care poate afecta femeile de orice vârstă, fiind diagnosticat, cel mai frecvent, la femeile de vârstă activă 35-44 de ani [68]. În ciuda eforturilor și progreselor făcute atât în depistarea cancerului de col uterin cât și în identificarea și aplicarea terapiilor optime pentru a îmbunătăți supraviețuirea fără semne de boala și supraviețuirea generală, sunt încă multe situații în care acestea nu dau rezultate. Se estimează că în lipsa unor măsuri adecvate, între 2018 și 2030, numărul anual de cazuri noi de cancer de col uterin va crește de la 570 000 la 700.000 iar numărul anual de decese de la 311 000 la 400 000 [69]. De aceea este necesară continuarea cercetărilor cu scopul de a identifica noi ținte terapeutice care pot conduce o calitate a vieții mai bună și la o supraviețuire mai îndelungată.

Ideal, diagnosticul carcinomului cervical ar trebui să se realizeze facil prin examinarea screening de rutină. Metoda de screening curentă este descrisă în ultimul ghid SOGR [26].

În ceea ce privește examinarea ginecologică, în cazul carcinomului cervical invaziv se decelează următoarele:

- examinarea cu valve sau specul evidențiază aspectul anormal al cervixului care este transformat tumoral cu aspect exofitic, polipoid, ulcerativ sau endofitic. În funcție de stadiu transformarea tumorală se poate extinde la pereții vaginali;
- tușeul vaginal evaluează dimensiunea tumorii cervicale, extensia patologiei tumorale la pereții vaginali, precum și prezența unor eventuale patologii asociate (formațiuni tumorale anexiale sau ale corpului uterin);
- tușeul rectal care evaluează extensia carcinomului cervical la nivelul parametrelor și spațiului rectovaginal. În trecut stadializarea carcinomului cervical fiind strict clinică.

Evaluarea preterapeutică a carcinomului cervical cuprinde: evaluarea funcției hematologice, hepatice și renale, ecografie transvaginală, radiografie pulmonară/CT torace. Începând cu stadiul IB, examinarea radio-imagistică prin CT/IRM torace, abdomen și pelvis este obligatorie [27,29]. Invazia vezicală sau rectală necesită confirmare bioptică [27,28].

Din 2019 până în prezent SOGR a emis 3 ghiduri clinice (în 2019, 2022 și 2024) care stabilesc conduita adecvată în cazul carcinomului cervical. Conduita terapeutică este stabilită în urma evaluării cazului în cadrul unei comisii multidisciplinare și ia în considerare mai multe aspecte, precum stadiul tumorii, dorința pacientei de a își menține fertilitatea, imposibilitatea sau opțiunea pacientei de a urma intervenția chirurgicală, starea de graviditate și invazia spațiului limfovacular. Diferențele dintre conduitele expuse în ghidurile menționate mai sus sunt minore, cu excepția accentuării rolului tehnicii ganglionului sentinela în ghidurile emise în 2022 și 2024 și modificării terapiei în cazul carcinomului cervical stadiu IA2 care avea indicație standard de histerectomie radicală modificată cu limfadenectomie pelvină conform ghidului din 2019, indicație care nu s-a menținut în ghidurile emise ulterior [26].

3. ASPECTE MORFOPATOLOGICE ALE CARCINOMULUI CERVICAL

OMS oferă un sistem de clasificare standardizat pentru cancerul de col uterin, care ajută la diagnosticarea, stadializarea și tratamentul acestei boli [30].

Conform acestui sistem de clasificare tumorile cervicale se împart în:

- tumori epiteliale scuamoase,
- tumori glandulare,
- tumori mixte și mezenchimale,
- tumori ale celulelor germinale.

Gradarea carcinoamelor cervicale scuamoase se efectuează după două sisteme: Broders – care utilizează 4 grade (bine, moderat și slab diferențiat și nediferențiat) și FIGO – care utilizează 3 grade (bine, moderat și slab diferențiat).

Stabilirea gradului adenocarcinoamelor cervicale a prezentat un subiect de dezbatere îndelungate și, până în prezent, nu există sistem validat care să poate fi aplicat universal. Acest aspect se poate datora și faptului că încă nu există consens asupra valorii prognostice a gradării.

Aspectul macroscopic al carcinomului cervical are un spectru foarte larg. Acesta include și formele incipiente care nu sunt însoțite de modificări macroscopice, iar eventualele leziuni sunt suspectate în urma examenului citobacteriologic Babeș-Papanicolaou și colposcopiei ulterioare.

Aspectele microscopice sunt foarte variate și depind în funcție de tipul tumoral.

Pentru *carcinomul cervical scuamos* au fost descrise mai multe modele histologice de creștere: noncheratinizant; cheratinizant; bazaloid; condilomatos (verucos); papilar; limfoepiteliom-like.

Pentru adenocarcinomul cervical HPV-dependent au fost descrise două tipuri histologice majore: tipul uzual (clasic) și cel mucinos.

4. MICROMEDIUL TUMORAL

Felul în care a fost înțeleasă dezvoltarea patologiei maligne a evoluat considerabil în ultimul deceniu. În prezent, oamenii de știință au realizat că patologia malignă nu este strict o boală genetică, ci un ecosistem complex care implică o multitudine de celule necanceroase și interacțiunile acestora cu celulele maligne.

Este evident că alterarea genetică este necesară, dar nu suficientă pentru începerea procesului malign și progresia acestuia. Sofisticarea patologiei maligne devine aparentă în urma examinării microscopice care atestă ca micromediul tumoral este un sistem înalt specializat care conține celulele maligne înconjurate de diverse alte celule necanceroase, care se află într-o matrice extracelulară vascularizată și modificată.

Micromediul tumoral conține o diversitate remarcabilă de celule imune, celule endoteliale, pericite, fibroblaste și alte tipuri de celule care sunt diferite în funcție de țesut precum neuroni sau adipocite. Până relativ de curând, aceste celule au fost percepute ca fiind strict spectatoare la procesul de tumorigeneză, dar în urma mai multor studii a fost stabilit că micromediul tumoral și moleculele secretate de acesta sunt critice în patogeniza malignă și din această cauză sunt considerate ținte terapeutice tentante.

În funcție de organul de unde se dezvoltă tumora, caracteristicile intrinseci ale celulelor maligne, stadiul tumoral și particularitățile pacientului, alcătuirea celulară și situația funcțională a micromediului tumoral va varia, iar unele celule din cadrul acestuia pot supresa sau susține dezvoltarea tumorală.

Prezența infiltratului tumoral limfocitar (tipul acestuia și cantitatea) la nivel tumoral reprezintă o imagine a interacțiunii dintre celulele imune ale gazdei la antigenele tumorale și micromediul tumoral. Analiza tipului de infiltrat tumoral limfocitar – numărul de celule și raportul acestora – poate oferi informații benefice despre progresia tumorii și prognosticul terapeutic. De obicei, infiltratul tumoral limfocitar în cazul CC este format din mai multe tipuri celulare imune precum celule CD4+ și CD8+, NK și celule T reglatoare; în unele rapoarte sunt descrise inclusiv macrofagele. Aceste celule imune nu pot elimina tumora, iar motivele pentru acest lucru sunt complexe. Dintre motive merită precizate două: fie aceste celule imune nu sunt suficiente sau sunt îmbătrânite sau există celule imunosupresive în infiltratul tumoral limfocitar [31], fie există un micromediu tumoral ce le inhibă activitatea [32]

Evaluarea infiltratului tumoral limfocitar devine din ce în ce mai importantă în încercarea de a descoperi un biomarker pentru selecția pacientelor care prezintă probabilitatea cea mai mare de a beneficia de imunoterapie.

Neoangiogeneza reprezintă procesul prin care se formează vase de sânge noi și care se dezvoltă din vasele preexistente. Acest fenomen se produce atât în condiții fiziologice, precum ar fi vindecarea rănilor sau dezvoltarea embrionară, cât și în condiții patologice, precum ar fi creșterea tumorilor, inflamațiile cronice sau boli ischemice.

În prezent, protocoalele care măsoară **densitatea microvasculară (DMV)** reprezintă un gold standard pentru evaluarea neovascularizației în tumorile maligne. Metoda utilizează markeri specifici pentru endoteliul vascular - cel mai frecvent CD31 și CD34 - și metode imunohistochimice pentru a evidenția microvasele [33]. Densitatea microvasculară de la nivelul tumorii primare se corelează considerabil cu producerea metastazelor și prognosticul în unele tumori și este considerată un factor predictiv valoros

în tumorile care induc angiogeneză considerabilă, în special carcinoamele mamare, prostatice și patologia malignă hematologică [34].

5. CARCINOMUL CERVICAL ÎN CADRUL INTELIGENȚEI ARTIFICIALE ȘI PATOLOGIEI DIGITALE

Inteligența artificială reprezintă o revoluție în multe domenii, patologia digitală numărându-se printre acestea. Pe scurt, inteligența artificială a crescut validitatea analitică a tehnicilor citopatologice tradiționale, a crescut acuratețea diagnostică și sensibilitatea, având ca rezultat o eficiență clinică sporită. Metodele ce utilizează inteligența artificială sunt separate în două mari categorii: una care utilizează protocoale de învățare automată (machine learning) și alta care utilizează protocoalele de învățare profundă (deep learning) [35].

Includerea sistemelor care utilizează inteligența artificială în managementul carcinomului cervical oferă posibilități sporite legate de acuratețea diagnostică, standardizarea mecanismului de screening și managementul personalizat al cazului.

În ceea ce privește screening-ul cancerului cervical, utilizarea inteligenței artificiale are potențialul de a îmbunătăți descoperirea leziunilor precanceroase și celulelor transformate malign. Există studii care atestă capacitatea sistemelor care utilizează inteligența artificială de a atinge acuratețe de 70-100% în identificarea leziunilor cervicale maligne [36]. Un alt studiu multicentric a demonstrat că inteligența artificială care folosește protocoale de învățare profundă a obținut sensibilitate de 94,6% și specificitate de 89% în interpretarea lamelor de citologie digitală [37]. Același studiu a demonstrat că un citolog asistat de inteligența artificială a prezentat o creștere de 13,3% a sensibilității diagnostice comparativ cu un citolog care nu a beneficiat de asistența inteligenței artificiale [37].

Histopatologia este o altă componentă din arsenalul diagnosticului patologic și reprezintă evaluarea fragmentelor tisulare provenite din diverse organe pentru a evalua și identifica anomaliile sau patologia existentă. La fel ca și evaluările citopatologice, histopatologia a avansat major prin metodele digitale prezente. Într-o analiză histopatologică, bioinformatica a fost utilizată pentru analiza probelor histopatologice necunoscute, descoperind sursa originală a malignității [38]. O analiză sistematică a fost efectuată asupra literaturii de specialitate legată de inteligența artificială și probele

histopatologice din cancerul ovarian, iar în urma acestei analize s-au constatat mai multe modele care pot fi implementate în lumea reală [39].

Patologia digitală reprezintă totalitatea acțiunilor de achiziție, gestionare, partajare și interpretare a informațiilor patologice, atât lame, cât și date, într-un mediu digital. Lamele digitale sunt create prin capturarea lamelor microscopice de sticlă cu un dispozitiv de scanare al cărui rezultat este furnizarea unei imagini cu rezoluție înaltă ce poate fi vizualizată pe ecranul unui computer sau dispozitiv mobil. Acest tip de examinare oferă următoarele beneficii: analiza îmbunătățită a lamei examinate, un grad mai mic de eroare, colaborare îmbunătățită între medici, oportunitatea de muncă la distanță, oportunități sporite pentru educația și formarea personalului medical, facilitarea cercetării și dezvoltării științifice [40,41].

Patologia digitală a fost dezvoltată major, mai ales prin vizualizarea și explorarea întregii imagini prezente pe lama histologică (WSI). Au fost raportate ghiduri de practică care prezintă aplicațiile evaluării întregii imagini de pe lama histologică și au fost efectuate studii pentru a valida interpretarea patologiei mamare și ginecologice care au atestat îmbunătățirea variabilității intra-observator [42].

Testarea imunohistochimică reprezintă evaluarea specimenului recoltat utilizând markeri imunohistochimici. Acești markeri imunohistochimici sunt anticorpi care detectează antigene specifice din țesutul examinat. Această metodă permite medicului anatomo-patolog să vizualizeze și evalueze anumite celule sau proteine și contribuie la diagnosticul și clasificarea bolilor, mai ales în cazul patologieilor maligne. Utilitatea testării imunohistochimice s-a extins ulterior, iar în prezent aceasta evaluează markeri predictivi și prognostici în multe patologii maligne [43,44]. Deși există ghiduri pentru validarea analitică standardizată a testelor imunohistochimice, multitudinea de markeri existenți este în continuă creștere, iar pentru unii dintre aceștia raportarea și interpretarea se poate face diferit [44-46]. Integrarea metodelor ce utilizează inteligența artificială împreună cu testarea imunohistochimică îmbunătățește performanța medicului anatomo-patolog [47-52].

QuPath este un program cu cod sursă deschis (open-source software) destinat patologiei digitale și analizei imaginilor biologice, caracterizat printr-o interfață facil de utilizat și extensibilă. Deși până în prezent există puține studii ale cancerului cervical care au utilizat QuPath, evaluări asociate susțin metoda – un studiu privind reproductibilitatea între platforme a constatat ”o reproductibilitate excelentă între trei platforme diferite de analiză digitală a imaginilor în cuantificarea scorului Ki-67” [53-56],

aplicarea QuPath pentru detecția markerilor celulelor imune [54] și analiza imaginilor digitale în diverse tipuri tumorale îmbunătățește reproductibilitatea și descrește variabilitatea inter-observator [57,58].

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

6. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Carcinoamele cervicale reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial, dar mai pronunțată la nivelul țărilor fără program de screening funcțional. Deși aceste tumori nu ridică probleme deosebite de diagnostic, cu excepția adenocarcinoamelor incipiente dezvoltate înalt la nivelul canalului endocervical, de cele mai multe ori diagnosticul acestora se face în stadiul avansat al bolii când opțiunile terapeutice sunt uneori limitate.

În România există puține studii despre carcinomul cervical, iar cele existente se referă în special la screening – participarea populației generale sau din anumite grupuri etnice la screening, provocările efectuării screeningului; evoluția incidenței diverselor patologii maligne ginecologice; testarea hr-HPV la nivelul populației, cunoașterea informațiilor despre HPV la nivelul populației.

Micro-mediul tumoral (TME) a devenit un domeniu de cercetare activ în ultimii ani, deoarece are o influență majoră asupra progresiei și metastazarea celulelor tumorale. TME este compus în mare parte din celule imune, fibroblaste, celule endoteliale, celule stromale și matrice extracelulară (ECM). Interacțiunile dintre tumori și celulele imune sunt mai complexe și dinamice decât se credea anterior. Multe subtipuri de celule imune infiltrate în TME posedă abilități puternice de promovare a tumorii. Cu toate acestea, impactul și interacțiunea dintre aceste procese fiziologice și dezvoltarea, invadarea și capacitatea de metastazare a celulelor maligne rămâne în continuare un subiect nedeplin elucidat.

Mecanismele imune implicate în cancerul cervical sunt evaluate prin analiza infiltratului limfocitar tumoral (TIL) și prin analiza expresiei imunohistochimice a biomarkerului CD8. Acestea vor sta la baza stabilirii corelațiilor ulterioare cu expresia PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) care este un biomarker esențial în imunoterapia cancerului, având un rol semnificativ în terapia personalizată a diferitelor tipuri de cancer.

Expresia imunohistochimică a PD-L1, atât la nivelul celulelor neoplazice maligne cât și la nivelul celulelor imune din micromediul tumoral, poate influența răspunsul la inhibitorii de puncte de control imunitar (ICI), cum ar fi inhibitorii PD-1 și PD-L1, utilizați pentru a stimula sistemul imunitar al organismului să atace celulele canceroase.

Un alt subiect important, este reprezentat de studiul factorilor care influențează angiogeneza, procesul de formare a noilor vase de sânge și de metastazarea a celulelor maligne. Factorii de creștere endotelial vascular (VEGF) sunt adesea supra-exprimați în tumori și sunt asociați cu un prognostic nefavorabil. În plus, hipoxia, sau lipsa de oxigen, este o caracteristică comună a TME și este asociată cu un comportament tumoral agresiv. Hipoxia induce factorul de transcripție HIF-1 α , care reglează genele implicate în angieneză, metabolismul celular și supraviețuirea celulară. Tumorile hipoxice sunt adesea mai rezistente la terapii convenționale precum radioterapia și/sau chimioterapia. Înțelegerea profundă a interacțiunilor complexe din micro-mediul tumoral și a factorilor care contribuie la apariția metastazelor limfatice este necesară pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice pentru cancerul cervical. Terapia antiangiogenică vizează inhibarea formării noilor vase de sânge în tumori, iar Bevacizumab, un inhibitor al VEGF, a demonstrat eficacitate în tratarea cancerului cervical avansat, precum și a altor patologii maligne.

Procesul de neoangieneză este analizat inițial prin evaluarea imunohistochimică a biomarkerului CD34 și cuantificarea microdensității vasculare (MVD) și stabilirea corelațiilor cu principalii factori de prognostic. Următoarea etapă constă în analiza expresiei biomarkerului endoglin (CD105) în cancerul cervical, un marker de actualitate și care reprezintă o țintă terapeutică pentru acesta. CD105 este o moleculă cu potențial vast în explorarea și terapia antitumorală datorită rolului său în sistemul de semnalizare TGF- β și exprimarea sa crescută la nivelul celulelor endoteliale proliferative.

Astfel, având în vedere incidența ridicată a cancerului cervical în absența unor programe eficiente de screening, precum și limitărilor terapeutice din stadiile avansate ale bolii, se impune o aprofundare a înțelegerii mecanismelor biologice implicate în progresia tumorală. Studiul micro-mediului tumoral — cu accent pe interacțiunile dintre celulele imune, factorii de angieneză și de evaziune imună — oferă perspective valoroase pentru identificarea unor biomarkeri cu valoare prognostică. În contextul terapiilor moderne, precum imunoterapia și tratamentele antiangiogenice, caracterizarea acestor mecanisme devine esențială pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate și eficiente în cancerul cervical.

Obiectivul principal al studiului doctoral este reprezentat de caracterizarea micromediului tumoral în cancerul cervical prin analiza relațiilor dintre parametrii clinico-biologici, histopatologici, imunologici și neoangiogenici și identificarea factorilor cu potențial prognostic în stratificarea pacienților cu cancer cervical.

Obiectivele secundare ale studiului doctoral constau în:

I. Evaluarea integrativă a parametrilor clinico-biologici și a caracteristicilor histopatologice și proteomice a cazurilor de cancer cervical, incluse în studiul actual

II. Caracterizarea distribuției infiltratului limfocitar tumoral (TILs) în conjuncție cu analiza distribuției și expresiei celulelor CD8+ TILs din micromediul tumoral în vederea evaluării rolului imunologic și prognostic al acestora.

III. Evaluarea neoangiogenezei din micromediul cancerului cervical prin analiza densității vasculare cu ajutorul expresiei imunohistochemice a biomarkerului CD34 și CD105 (endoglină) și corelația acesteia cu parametri clinico-patologici.

IV. Evaluarea expresiei imunohistochemice a biomarkerului PD-L1 în cancerul cervical și analiza corelațiilor acesteia cu parametrii imunologici și neoangiogenici din micromediul tumoral, în vederea înțelegerii rolului imuno-evaziv și a potențialului rol prognostic terapeutic.

Scopul studiului doctoral:

Prin investigarea simultană a infiltratului limfocitar tumoral, a proceselor de neoangieneză și a mecanismelor de evaziune imună, studiul doctoral contribuie la o înțelegere aprofundată a interacțiunilor dintre celulele neoplazice maligne invazive și micromediul acestora, facilitând astfel dezvoltarea unor strategii terapeutice moderne, cum sunt imunoterapia și tratamentele antiangiogenice. Mai mult, corelarea acestor date cu profilul clinic și histopatologic al pacienților oferă un cadru valoros pentru cercetări viitoare și pentru stratificarea pacienților în vederea implementării tratamentului personalizat în practica medicală.

7. MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul doctoral s-a realizat în Cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sfântul Apostol Andrei” Constanța (SCJU Constanța) în colaborare cu Centrul de Cercetare Dezvoltare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă (CEDMOG) din cadrul universității „Ovidius” Constanța. Acest studiu retrospectiv include 50 de pacienți și este realizat pe baza informațiilor

obținute atât din baza de date electronică a SCJU Constanța, cât și a datelor extrase din foile de observație. Cohorta de studiu a inclus 50 de cazuri diagnosticate morfopatologic cu carcinom cervical în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență “Sfântul Apostol Andrei” Constanța în perioada ianuarie 2019 – decembrie 2021.

Criteriile de includere au fost reprezentate de:

1. paciente internate și investigate în cadrul secțiilor clinice de obstetrică-ginecologie ale SCJU Constanța;
2. paciente nou diagnosticate cu cancer cervical, fără terapie neoadjuvantă (chimioterapie sau radioterapie anterior stabilirii diagnosticului);
3. paciente cu diagnostic morfopatologic de carcinom primar al cervixului, realizat pe baza examenului la parafină a pieselor operatorii (biopsie cervicală sau histerectomie totală/radicală) în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al SCJU „Sfântul Apostol Andrei” Constanța;
4. disponibilitatea unui material biologic suficient pentru a efectua toate investigațiile imunohistochimice ulterioare;
5. paciente fără terapie imunosupresivă sau biologică la momentul diagnosticului sau în ultimile 12 luni anterioare diagnosticului.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de:

1. cazurile cu diagnostic anatomo-patologic realizat în afara SCJU „Sfântul Apostol Andrei” Constanța;
2. cazurile cu diagnosticul histopatologic de leziuni benigne prezente la nivel cervical;
3. cazuri cu diagnostic morfopatologic de tumoră malignă cervicală cu altă origine morfologică decât cea epitelială;
4. cazurile reprezentate de tumori cervicale secundare / metastaze;
5. cazurile cu material biologic insuficient sau cu necroză tumorală extensivă.

Acest studiu a fost realizat după obținerea aprobării studiului de la Comitetul de Etică al SCJU “Sfântul Apostol Andrei” Constanța (42006/02.09.2020), în conformitate cu Declarația de la Helsinki și ghidurile internaționale recunoscute [59]. Pentru fiecare pacientă s-a identificat “Fișa de Consimțământ Informat” semnată în momentul internării.

Probele biologice ale acestor cazuri, reprezentate de blocurile de parafină ale pacientelor arhivate în histoteca Spitalului Clinic județean de Urgență “Sfântul Apostol

Andrei” Constanța au fost recuperate și s-au examinat din punct de vedere al calității în vederea efectuării testelor imunohistochimice.

Fiecare caz a fost analizat, atât din punct de vedere al aspectelor morfopatologice, cât și din punct de vedere al rezultatelor examinărilor imunohistochimice, de către doi medici anatomo-patologi, din cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al SCJU “Sfântul Apostol Andrei” Constanța.

Evaluarea imunohistochimică s-a efectuat pentru biomarkerii Ki67, p53, CD8, CD34, CD105 (endoglin) și PD-L1. De asemenea, s-a evaluat și TILs stromal.

8. EVALUAREA INTEGRATIVĂ A PARAMETRILOR CLINICO-BIOLOGICI ȘI A CARACTERISTICILOR HISTOPATOLOGICE ȘI PROTEOMICE A CAZURILOR DE CARCINOM CERVICAL INCLUSE ÎN STUDIU

Acest studiu inițial are ca scop caracterizarea complexă a cohortei de paciente diagnosticate cu carcinom cervical din punct de vedere al vârstei, mediului de proveniență, parametrilor clinici, paraclinici, morfologici și imunohistochimici și identificarea elementelor ce pot prezice un comportament tumoral agresiv.

Obiectivele secundare ale acestui studiu sunt reprezentate de:

- identificarea markerilor biologici care prezintă un potențial rol prognostic în identificarea cazurilor cu evoluție severă, care pot avea și un potențial rol predictiv, ce necesită validare în studii prospective;
- identificarea corelațiilor cu semnificație statistică dintre diferiți parametrii clinici, paraclinici, morfologici și imunohistochimici (Ki67 și p53) ce pot avea rol prognostic în depistarea cazurilor cu prognostic sever.

Studiul include un număr de 50 de cazuri diagnosticate în perioada ianuarie 2019 – decembrie 2021, majoritatea din mediul urban (52%), cu vârste cuprinse între 32 de ani și 83 de ani, la momentul internării și stabilirii diagnosticului de cancer cervical, cu o valoare medie de 55,54 ani. Cele mai multe paciente s-au încadrat în categoria de vârstă 45-69 ani, cu o frecvență de 66% (33/50) urmate de cele mai mici sau egale cu vârsta de 44 ani cu o frecvență de 22% (11/50). Aceste date sunt în concordanță cu datele statistice oferite de Institutul Național de Sănătate Publică oferite recent [60]. Din punct de vedere

al mediului de proveniență, majoritatea pacienților au fost din mediul urban (52%), cele mai multe cazuri fiind cuprinse între 50 și 69 de ani.

Din punct de vedere al stadiului clinic, analiza statistică a evidențiat o frecvență mai mare a cazurilor incluse în stadiul III (36%) urmate de cele incluse în stadiul II (34%), fără a se evidenția diferențe semnificative între mediul de proveniență. De asemenea, în lotul de studiu s-a constatat o frecvență ușor crescută a cazurilor diagnosticate în stadiu avansat de boală – 52% dintre paciente au fost diagnosticate când se aflau deja în stadiu III-IV comparativ cu 48% dintre paciente care au fost diagnosticate când se aflau în stadiu I-II de boală.

Nu s-au constatat asocieri statistice între vârstă, mediul de proveniență, stadiul bolii sau gradul histologic.

Din punct de vedere al aspectelor morfopatologice, majoritatea cazurilor incluse în studiul actual au fost diagnosticate cu carcinom scuamocelular 96% (48/50) și două cazuri cu diagnosticul de adenocarcinom cervical 4% (2/50). Din cazurile cu diagnostic de carcinom scuamos, cele mai multe au fost reprezentate de subtipul carcinom scuamocelular cheratinizat 52% (26/48) urmate de formele de carcinom scuamocelular noncheratinizat 32% (16/48).

Dintre cazurile incluse în studiul actual, diagnosticul de adenocarcinom endocervical a fost identificat la două paciente, ambele fiind moderat diferențiate G2, tipul uzual non-mucinos cu pattern de invazie de tip distructiv - pattern C - conform sistemului de clasificare Silva. Sistemul Silva, care pune accent pe pattern-ul de creștere și de invazie a celulelor neoplazice maligne, se asociază cu riscul de apariție a metastazelor limfoganglionare, cu recurența tumorii și cu supraviețuirea fără semne de boală [61,62].

În urma analizei cazurilor din punct de vedere al gradului tumoral s-a remarcat o pondere crescută a formele de cancer cervical de grad histologic G3 (slab diferențiat) – 70% majoritatea fiind identificate la pacientele cu vârstă cuprinsă între 45 și 69 ani. Nu s-au constatat asocieri între stadiul de boală și gradul histologic.

Au fost constatate rezultate cu semnificație statistică în cazul stadiului de boală și nivelul leucocitelor sanguine, precum și creatininei serice.

În lotul studiat invazia limfovasculară a fost prezentă în 19 cazuri (38%) și absentă în 31 de cazuri (62%). Analiza statistică a arătat o asociere semnificativă între stadiul clinic

și invazia spațiului limfovascular, indicând că valorile unei variabile influențează în mod clar valorile celeilalte.

În lotul studiat, rata de proliferare Ki67 a fost clasificată în trei categorii: < 30% (proliferare redusă), 30–50% (proliferare moderată) și >50% (proliferare înaltă), cu rate relativ echilibrate (18%, 40%, 42%).

Analiza statistica a demonstrat asociere semnificativă între indicele de proliferare Ki67 și vârstă, stadiu clinic, grad histologic și ILV, ce demonstrează că există o tendință ușor crescătoare a ratei de proliferare nucleare odată cu înaintarea în vârstă a pacientelor.

În studiul curent s-a identificat o frecvență crescută (64%) a cazurilor cu expresia imunohistochimică pentru anticorpul p53 cu pattern de tip mutațional, restul prezentând un pattern non-mutațional de tip “wild-type”. Dintre cazurile cu pattern mutațional, cele mai frecvente au fost cele de tip “null-type” cu o rată de 42% (21/50) și 22% (11/50) au prezentat un pattern mutațional cu supra-expresia proteinei p53. Patternul expresiei p53 s-a asociat semnificativ cu stadiul bolii, gradul histologic, ILV și indicele proliferativ Ki67.

Studiul efectuat oferă o caracterizare care integrează parametri clinico-biologici, histopatologici și imunohistochimici ai carcinomului cervical, cu accent pe expresia markerilor Ki67 și p53. Analizarea celor 50 de cazuri incluse în studiu a demonstrat o serie de corelații semnificative relevante din punct de vedere clinic și prognostic:

(1) invazia limfovasculară și valorile crescute ale indicelui proliferativ Ki67 se asociază cu stadiile FIGO avansate și cu gradul histologic slab diferențiat (G3) în felul acesta delimitându-se un fenotip tumoral cu agresivitate sporită.

(2) Patternul mutațional al expresiei p53 a fost mai frecvent întâlnit în tumorile slab diferențiate și în stadiile FIGO avansate și a prezentat corelație cu un indice proliferativ crescut ceea ce sugerează o legătură între instabilitatea genetică și comportamentul biologic agresiv al tumorilor evaluate.

Din punct de vedere clinic, aceste constatări confirmă valoarea markerilor Ki67 și p53 ca factori cu valoare prognostică în stabilirea evoluției tumorilor cervicale și oferă premise pentru includerea lor în algoritmi de stratificare a riscului. Adicional, asocierea dintre invazia limfovasculară și stadiile FIGO avansate indică valoarea evaluării sistematice a acestora în practica curentă.

9. CARACTERIZAREA DISTRIBUȚIEI INFILTRATULUI TUMORAL LIMFOCITAR (TILs) ÎN CONJUNCȚIE CU ANALIZA DISTRIBUȚIEI ȘI EXPRESIEI CELULELOR CD8⁺TILs DIN MICROMEDIUL TUMORAL ÎN VEDEREA EVALUĂRII ROLULUI IMUNOLOGIC ȘI PROGNOSTIC AL ACESTORA

Acest studiu are drept obiectiv principal evaluarea componentei imune din micromediul tumoral, prin analiza nivelurilor de distribuție TILs și al limfocitelor T citotoxice CD8⁺ (CD8⁺TILs) în cancerul cervical, prin corelarea densității acestora cu parametrii clinici, paraclinici, morfologici, imunohistochimici în vedere identificării elementelor ce pot prezice comportamentul tumoral agresiv.

Obiectivele secundare ale acestui studiu sunt reprezentate de:

1. Analiza densității TILs și CD8⁺TILs în funcție de parametri demografici (vârstă și mediul de proveniență), clinici (stadiu FIGO) și morfopatologici (grad tumoral, invazie limfovaculară, expresie Ki67 și p53), pentru a identifica asocieri cu posibile implicații prognostice.
2. Evaluarea valorii prognostice a infiltratului limfocitar tumoral stromal (TILs) și a limfocitelor T CD8⁺ intratumorale în cancerul cervical.

Pentru o caracterizare imunologică detaliată a micromediului tumoral s-a efectuat analiza morfologică și imunohistochimică a infiltratului limfocitar tumoral (TILs) și a limfocitele T citotoxice CD8⁺ (CD8⁺TILs) pentru toate cele 50 de cazurile incluse în studiu pe baza criteriilor descrise anterior

În lotul studiat 25/50 de paciente (50%) au prezentat TILs crescut, 15/50 de paciente (30%) au prezentat TILs moderat și doar o minoritate dintre acestea 10/50 de paciente (20%) au prezentat TILs redus. Analiza statistică a demonstrat că TILs s-a asociat cu stadiul FIGO.

Studiul a demonstrat că densitatea crescută a TILs, în special a celui CD8⁺, se corelează cu stadiile incipiente FIGO, absența invaziei limfovaculară, rata scăzută de proliferare tumorală evaluată prin markerul Ki67 și expresia patternului non-mutațional al p53, ceea ce întărește valoarea lor prognostică favorabilă. Legat de supraviețuire, am constatat că pacientele cu infiltrat imun crescut au prezentat o perioadă de supraviețuire

globală semnificativ mai mare și un risc diminuat pentru deces. Astfel, CD8⁺TILs se dovedește a fi un marker biologic cu valoare clinică prognostică.

10. EVALUAREA NEOANGIOGENEZEI DIN MICROMEDIUL CANCERULUI CERVICAL PRIN ANALIZA DENSITĂȚII VASCULARE CU AJUTORUL EXPRESIEI IMUNOHISTOCHIMICE A BIOMARKERILOR CD34 ȘI CD105 (ENDOGLINĂ) ȘI CORELAȚIA ACESTEIA CU PARAMETRI CLINICO-PATOLOGICI

Acest studiu are drept obiective evaluarea densității microvascularizației tumorale prin analiza expresiei imunohistochimice a markerilor endoteliali CD34 și CD105 (endoglină) și corelarea acestora cu parametrii clinici, paraclinici, morfologici și imunohistochimici în vederea identificării elementelor prognostice legate de comportamentul tumoral agresiv.

Obiectivele secundare ale acestui studiu sunt reprezentate de:

1. Investigarea corelațiilor dintre densitatea microvasculară evaluată prin markerii CD34 și CD105 și parametrii clinico-morfologici și imunohistochimici cu relevanță prognostică.
2. Rolul biomarkerilor CD34 și CD105 în stratificarea riscului la pacientele cu cancer cervical.

Tabel 1. Încadrarea valorilor markerilor vasculari utilizați

Parametrul	CD34		CD105	
Valori obținute pe baza mediei a 5 HPF	Media: 19,304 ± 8,35		Media: 12,702 ± 4,87	
	Mediana: 18 (minim 5 – maxim 34)		Mediana: 13 (minim 3 – maxim 24,2)	
Densitate DMV	Scăzută (<18)	Crescută (≥18)	Scăzută (<13)	Crescută (≥13)
Cazuri (N)	23	27	24	26
Cazuri (%)	46%	54%	48%	52%

Tumorile cu DMV-CD105 crescută prezintă mai des invazie limfovasculară, un indice de proliferare crescut, expresie p53 sub forma de pattern mutațional și distribuție CD8⁺TILs cu densitate scăzută, iar toate acestea sunt elemente care caracterizează agresivitatea tumorală și sugerează prognosticul nefavorabil. De asemenea, densitatea microvasculară crescută s-a asociat cu risc de deces mai mare pentru ambii markeri ceea ce confirmă valoarea prognostică nefavorabilă. În studiul curent atât CD34, cât și CD105 (endoglină) au accentuat faptul că densitatea microvasculară crescută se corelează cu o perioadă de supraviețuire globală mai redusă. CD105 s-a dovedit a fi mai sensibil în corelarea cu stadiul FIGO și alți parametri precum invazia limfovasculară, indicele de proliferare, patternul p53 și distribuția CD8

Este deosebit de important ca analiza angiogenică să aibă ca punct final implementarea clinică în vederea stratificării pacientelor care pot beneficia și de terapie anti-angiogenică asociată sau nu cu imunoterapie și în felul acesta de ameliorarea prognosticului și calității vieții.

Direcțiile viitoare ale cercetării se pot axa pe: studii prospective care evaluează corelarea densității microvasculare cu răspunsul la terapii anti-angiogenice asociate sau nu cu imunoterapie; explorarea markerilor serici (endoglina circulantă sau VEGF plasmatic) ca o alternativă neinvazivă sau test surogat și studierea diferențelor dintre subtipurile histologice (carcinom cervical scuamos versus adenocarcinom).

11. EVALUAREA EXPRESIEI IMUNOHISTOCHIMICE A BIOMARKERULUI PD-L1 ÎN CANCERUL CERVICAL ȘI ANALIZA CORELAȚIILOR ACESTUIA CU PARAMETRII IMUNOLOGICI ȘI NEOANGIOGENICI DIN MICROMEDIUL TUMORAL, ÎN VEDEREA ÎNȚELEGERII ROLULUI IMUNOEVAZIV ȘI A POTENȚIALULUI ROL PROGNOSTIC TERAPEUTIC

Obiectivul principal al acestui studiu este evaluarea expresiei imunohistochimice PD-L1 în cancerul cervical și identificarea corelațiilor în relație cu markerii imunologici (CD8⁺TILs) și angiogenici (DMV-CD34/CD105).

Obiectivele secundare sunt reprezentate de:

1. Explorarea relației funcționale între neoangieneză (CD105/CD34) și expresia PD-L1 în contextul evaziunii imune tumorale. Acest obiectiv investighează ipoteza că un microambient tumoral hipoxic intens vascularizat poate stimula exprimarea PD-L1, limitând infiltrarea limfocitară și facilitând progresia tumorală.
2. Stabilirea semnificației clinico-prognostice a expresiei combinate dintre expresia PD-L1 și markerii angiogenici (CD 34 și CD105) și imunologici (TILs și CD8⁺TILs) în cancerul cervical cu scopul de a identifica metoda cea mai eficientă de stratificare a pacienților în funcție de risc și răspuns terapeutic

Din cele 50 de paciente diagnosticate cu cancer cervical incluse în analiză, 34 (68%) au prezentat expresie pozitivă a PD-L1 cu un scor CPS >1, iar 16 (32%) au fost clasificate ca PD-L1 negativ, cu scor CPS <1. Vârsta medie pentru pacientele cu status PD-L1 pozitiv a pacienților a fost de 55.56±14,26 iar pentru un status PD-L1 negativ a fost de 55.0±11,96.

În studiul curent expresia PD-L1 pozitivă a fost identificată la un procent mare de paciente cu cancer cervical, frecvent între 45-69 ani și poate avea relevanță prognostică și terapeutică (imunoterapie anti-PD-1/PD-L1). Un status PD-L1 pozitiv s-a corelat cu stadiul FIGO avansat (III-IV), cu invazia limfovasculară și cu indicele Ki67 crescut, toate acestea reflectând agresivitatea biologică tumorală.

Patternul mutațional p53 a fost semnificativ mai frecvent în cazurile PD-L1 pozitive, sugerând un fenotip tumoral genomic instabil ce se asociază cu prognostic nefavorabil.

De asemenea, expresia pozitivă pentru PD-L1 a fost asociată cu o supraviețuire mai redusă, fiind astfel considerat un factor de prognostic negativ, CD8⁺-TILs cu densitate crescută a fost asociată cu un prognostic favorabil, confirmând din nou rolul important al răspunsului imun antitumoral.

Asocierea evaluării PD-L1 cu CD8⁺, permite, în teorie, stratificarea mai precisă a riscului și selecția adecvată a pacienților ce pot beneficia de imunoterapie.

În urma analizei statistice s-a identificat o asociere semnificativă statistic între expresia PD-L1 și parametrii clinico-morfologici și imunohistochimici cu impact negativ asupra prognosticului (Tabel 2).

Tabel 2. Distribuția cazurilor în funcție de expresia PD-L1 și stadiul FIGO, gradul histologic, invazia limfovasculară, indexul Ki-67 și patternul de expresie al p53.

Parametru analizat	PD-L1 negativ n (%)	PD-L1 pozitiv n (%)	Test χ^2/Fisher; p	ρ Spearman p
Stadiu FIGO (I–II / III–IV)	I–II: 14 (87,5%); III–IV: 2 (12,5%)	I–II: 10 (29,4%); III–IV: 24 (70,6%)	$\chi^2(1)=14,708$; p<0,001	$\rho=0,542$; p<0,001
Grad de diferențiere (G1–G2 / G3)	G1–G2: 7 (43,8%); G3: 9 (56,3%)	G1–G2: 8 (23,5%); G3: 26 (76,5%)	Fisher p=0,191	$\rho=0,206$; p=0,152
ILV (absent / prezent)	Absent: 12 (75,0%); Prezent: 4 (25,0%)	Absent: 7 (20,6%); Prezent: 27 (79,4%)	$\chi^2(1)=13,672$; p<0,001	$\rho=0,523$; p<0,001
Index Ki67 (<42% / $\geq$42%)	<42%: 11 (68,8%); $\geq$ 42%: 5 (31,3%)	<42%: 9 (26,5%); $\geq$ 42%: 25 (73,5%)	$\chi^2(1)=8,104$; p=0,004	$\rho=0,403$; p=0,004
p53 (non-mutational / mutational)	Non-mut.: 12 (75,0%); Mut.: 4 (25,0%)	Non-mut.: 6 (17,6%); Mut.: 28 (82,4%)	$\chi^2(1)=15,533$; p<0,001	$\rho=0,557$; p<0,001

Evaluarea rolului prognostic al biomarkerului PD-L1

Evaluarea rolului prognostic al biomarkerului PD-L1 a fost realizat prin analiza supraviețuirii globale (OS). Analiza univariată de regresie Cox a confirmat faptul că statusul PD-L1 negativ este asociat cu o reducere semnificativă a riscului de deces rezultat ce sugerează un rol protector al statusului PD-L1 negativ pentru pacientele cu cancer cervical. În modelul de regresie Cox multivariată au fost incluse variabilele care au prezentat semnificație statistică în analiza univariată, precum și variabile de interes clinic, pentru a evalua efectul independent al expresiei PD-L1 asupra supraviețuirii globale (Tabel 6). Astfel, s-a constatat că parametrii care influențează OS sunt vârsta, stadiul clinic FIGO, rata de proliferare nucleară Ki67, distribuția CD8+TILs, densitatea microvasculară cuantificată prin CD34 și CD105 și patternul mutațional sau non-mutațional al proteinei p53.

Analiza de supraviețuire globală a evidențiat că statusul PD-L1 pozitiv și un nivel crescut de celule inflamatorii tumorale CD8⁺(CD8- DC) s-au asociat cu un prognostic favorabil.

În schimb, vârsta mai avansată, stadiul FIGO avansat (III–IV), microvascularizație (CD34, CD105) cu densitate crescută, expresia ridicată Ki67 și statusul mutațional al p53 s-au corelat cu o supraviețuire semnificativ mai redusă.

Analiza multivariată: PD-L1 și nivelul de distribuție TILs/CD8+TILs

Analiza multivariată de regresie Cox ce a evaluat impactul statusului PD-L1 (pozitiv sau negativ) și al nivelului infiltratului limfocitar tumoral (TILs - scăzut, moderat, intens) asupra supraviețuirii totale, a evidențiat lipsa unei asocieri semnificative a statusului PD-L1 cu supraviețuirea totală în cadrul acestui model ale.

Modelul de a analiza multivariată de regresie Cox ce a inclus statusul expresiei PD-L1 și nivelul de distribuție a infiltratului limfocitar CD8⁺TILs pentru a investiga impactul independent al expresiei proteinei PD-L1 și al infiltratului limfocitar CD8⁺ asupra supraviețuirii generale a pacientelor a demonstrat că expresia pozitivă a PD-L1 s-a asociat cu un risc semnificativ crescut de eveniment. Această asociere indică faptul că expresia PD-L1 se comportă ca un factor de prognostic negativ. În paralel, infiltratul limfocitar de tip CD8⁺- DC a fost asociat cu un efect protector semnificativ asupra supraviețuirii. Aceste date evidențiază rolul potențial independent și complementar al expresiei PD-L1 și al distribuției infiltratului CD8⁺ ca markeri prognostici în patologia analizată. Utilizarea lor combinată poate contribui la o mai bună stratificare a riscului și la selectarea pacientelor eligibile pentru terapii imunomodulatoare specifice.

Analiza multivariată: PD-L1 și CD34/CD105

Modelul de regresie Cox multivariată, care a evaluat expresia PD-L1 în combinație cu distribuția microvasculară marcată prin CD34 (DMV CD34), a evidențiat un efect semnificativ al PD-L1 asupra supraviețuirii, în timp ce efectul DMV CD34 nu a atins pragul de semnificație statistică indicând o asociere semnificativă între expresia pozitivă a PD-L1 și riscul crescut de deces. Aceste date sugerează că PD-L1 rămâne un marker de prognostic negativ, independent de statusul vascularizației tumorale marcat prin CD34.

Într-un model similar, s-a analizat impactul expresiei PD-L1 în asociere cu distribuția microvasculară marcată prin CD105 (DMV CD105), dar rezultatele au indicat un efect nesemnificativ pentru PD-L1 și CD105

Pe baza rezultatelor obținute în urma analizei multivariate, unde s-a observat că atât prezența expresiei PD-L1 cât și nivelul celulelor limfocitare tumorale CD8⁺ influențează în mod semnificativ prognosticul: PD-L1 pozitiv a fost asociată cu un risc crescut de deces, iar prezența unui infiltrat CD8⁺TILs crescut (CD8⁺-DC) a fost corelată cu un risc scăzut. Aceste rezultate sugerează că fiecare marker are un rol important în evoluția bolii și pentru a înțelege mai bine cum interacționează acești factori, pacienții au fost grupați astfel: PD-L1 negativ / CD8⁺-DS; PD-L1 negativ / CD8⁺-DC; PD-L1 pozitiv / CD8⁺-DS și PD-L1 pozitiv / CD8⁺-DC.

Această stratificare a permis evaluarea diferențelor de supraviețuire între combinații specifice ale acestor doi biomarkeri. Rezultatele Kaplan-Meier au arătat diferențe semnificative statistic între grupuri (Log-Rank, $p < 0,001$), confirmând utilitatea acestei abordări. Grupul PD-L1 pozitiv / CD8⁺-DS a prezentat cel mai mare număr de evenimente cu o rată de supraviețuire de doar 25%. La polul opus, grupul PD-L1 negativ / CD8⁺-DC nu a înregistrat niciun eveniment, toate paciente fiind în viață la finalul perioadei de urmărire (supraviețuire 100%). Astfel, putem concluziona ca expresia PD-L1 pozitivă este un factor de risc major pentru OS redusă, iar un infiltrat CD8⁺-TILs abundent (DC) are un efect protector, îmbunătățind prognosticul chiar și în prezența PD-L1 pozitiv.

12. CONCLUZII GENERALE

Lucrarea curentă demonstrează rolul important pe care markerii imunologici și angiogenici îl au în cadrul cancerului cervical de origine epitelială.

Pe lângă aceștia am demonstrat că din parametrii clinico-biologici evaluați invazia limfovaculară și valorile crescute ale indicelui proliferativ Ki67 se asociază cu stadiile FIGO avansate și cu gradul histologic slab diferențiat (G3) - în felul acesta delimitându-se un fenotip tumoral cu agresivitate sporită. De asemenea, patternul mutațional al expresiei p53 a fost mai frecvent întâlnit în tumorile slab diferențiate și în stadiile FIGO avansate și s-a corelat cu un indice proliferativ crescut, ceea ce sugerează o legătură între instabilitatea genetică și comportamentul biologic agresiv al tumorilor evaluate.

Practic, indicele Ki67 de proliferare nucleară și patternul p53 rămân repere importante în vederea caracterizării tumorale, iar interpretarea lor integrată cu markerii

micromediului tumoral (imuni și vasculari) aduc o valoare suplimentară în ceea ce privește prognosticul și au potențial predictiv.

Densitatea crescută a infiltratului tumoral limfocitar (TILs), în special subsetul CD8⁺, care se corelează cu stadiile FIGO incipiente, absența invaziei limfovaskulare, indice de proliferare Ki67 scăzut și pattern non-mutațional al p53 sunt elementele cu valoare prognostică favorabilă.

Pacientele cu infiltrat imun intens prezintă supraviețuire globală mai bună și un risc diminuat de deces, ceea ce susține importanța răspunsului imun antitumoral în controlul progresiei tumorale

Expresia PD-L1 s-a asociat cu factori de agresivitate tumorală precum stadiul FIGO avansat, invazia limfovaskulară, indicele de proliferare Ki67 crescut și pattern p53 mutațional. Totuși interpretarea PD-L1 este mult mai importantă atunci când este evaluată în raport cu prezența infiltratului CD8⁺. Asocierea dintre PD-L1 pozitiv și CD8⁺ cu densitate crescută definește un subgrup de paciente cu profil imunologic cu implicații directe asupra răspunsului la terapii imunologice anti PD-1/PD-L1.

Evaluare densității microvasculare prin utilizarea CD34 și CD105 (endoglină) a demonstrat corelații cu parametride agresivitate clinică și histologică ceea ce susține rolul prognostic al neoangiogenezei și utilizarea acestora ca ținte terapeutice prin terapie anti-angiogenică.

Aceste rezultate ale unei analize ce a inclus mai multe elemente încurajează integrarea parametrilor imunologici și vasculari în algoritmi de stratificare a riscului și în dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate care să se adauge celor utilizate și considerate deja tradiționale în prezent (terapie chirurgicală, chimi- și radioterapie neoadjuvantă/adjuvantă).

Rezultatele obținute atestă faptul că patologia malignă cervicală nu trebuie privită doar prin lentila morfologiei tradiționale, clasice, ci necesită o caracterizare extinsă – moleculară și imunologică – pentru a oferi pacientelor tratamente adaptate în funcție de profilul biologic al tumorii. Aceste intervenții terapeutice pot influența semnificativ perioada de supraviețuire, dar poate că la fel de important, și calitatea vieții pacientelor.

În concluzie, propunem un protocol de stratificare a riscului bazat pe cohorta de paciente incluse în studiu, care are drept obiectiv integrarea parametrilor clinico-morfologici cu biomarkerii evaluați pentru a delimita categorii de risc și subgrupuri biologice utile în discuția din comisia multidisciplinară.

Stratificarea propusă se realizează în două etape:

- prima etapă stabilește riscul clinic de bază folosind stadiul clinic FIGO, gradul histologic, prezența invaziei limfovaskulare și statusul limfoganglionar (când este disponibil), cu încadrarea pacienților în 3 grupuri de risc clinic (Rc): scăzut (Rc-0) = stadiu FIGO incipient (I sau II) + ILV absentă + G1/G2 ± LN0; intermediar (Rc-1) = stadiu FIGO incipient (I sau II) + ILV prezentă ± G3 ± LN0; înalt (Rc-2) = stadiu FIGO avansat (III sau IV) + ILV prezentă ± G3 ± LN1;
- a doua etapă analizează profilul biologic tumoral și este alcătuită din evaluarea a 3 componente: 1) rata de proliferare/ profil genomic = index Ki67 „înalt” și/sau p53 aberant (absent – 0 puncte, prezent – 1 punct); 2) profilul imunologic = TILs și/sau CD8 scăzute (absent – 0 puncte, prezent – 1 punct); neoangiogeneza = DMV crescut, în special CD105 sau CD34 (absent – 0 puncte, prezent – 1 punct). Suma punctelor (0–3) reprezintă scorul riscului biologic (Rb).

Riscul final (Rf) este alcătuit din riscul clinic compus cu riscul biologic: risc scăzut (Rc-0 și Rb 0-1); risc intermediar când există discordanțe moderate între clinic și biologic (Rc -0 dar Rb 2–3 sau Rc-1 cu Rb 0–1); risc înalt (Rc-2 sau Rc-1 se asociază cu Rb 2–3).

Pentru ca protocolul să fie reproductibil, raportul trebuie să precizeze tipul probei (biopsie/piesă chirurgicală), zonele analizate și metodele și valorilor „cut-off” de evaluare a biomarkerilor și, când este cazul, heterogenitatea intratumorală (distribuția imunomarcajului focală sau difuză, predominant periferic sau intratumoral).

Punctele forte ale acestui studiu sunt reprezentate de designul complex care integrează multiple date clinice, morfologice și imunohistochimice și analiza mai multor markeri relevanți precum Ki-67, p53, CD8, CD34, CD105 și PD-L1, oferind o imagine complexă asupra microambientului tumoral și a mecanismelor prognostice.

Dezavantajele studiului sunt legate de numărul mic de cazuri (lot format din 50 de pacienți – 48 de cazuri de carcinom scuamos și două cazuri de adenocarcinom); designul retrospectiv; absența evaluării răspunsului terapeutic la imunoterapie și absența unor date moleculare (de ex. status infecție HPV, analize genetice).

Considerăm că direcțiile viitoare de studiu ar trebui să se axeze pe studii multicentrice și prospective cu eventuala integrare a statusului infecției HPV și evaluarea în dinamică pre- și postterapie pentru stabilirea cât mai precisă a pacienților care pot beneficia de imunoterapia cu inhibitori PD-1/PD-L1. Deosebit de importantă este și investigarea interacțiunii dintre neoangiogeneza care se poate face prin multipli markeri și

evaziunea imună (PD-L1/CD8⁺) pentru dezvoltarea și aplicarea de terapii combinate care for influența benefic prognosticul și calitatea vieții pacientelor cu cancer cervical.

13. ORIGINALITATEA TEZEI

Teza prezentă de doctorat reprezintă o contribuție originală atât în domeniul anatomiei patologice, cât și în domeniul oncologiei ginecologice, prin abordarea parametrilor imunologici și angiogenici în cancerul cervical de origine epitelială.

Elementele de noutate și originalitate constau în următoarele:

1. Analiza integrativă a markerilor imunohistochimici Ki67, p53, PD-L1, a infiltratului tumoral limfocitar (TILs și CD8⁺) și a markerilor vasculari (CD34 și CD105) corelate cu datele clinico-patologice, bazate pe tehnici moderne de analiză computerizată a imaginilor. Acest studiu este unic atât prin complexitatea parametrilor analizați concomitent cât și prin utilizarea tehnicilor moderne de patologie digitală.
2. Raportarea valorii prognostice a subsetului CD8⁺TILs care are un impact asupra perioadei de supraviețuire și riscului de deces
3. Stabilirea interacțiunilor dintre expresia PD-L1 și CD8⁺TILs, aspect care permite stratificarea mai precisă a prognosticului și prezintă un potențial de aplicabilitate în eligibilitatea pacientelor pentru terapii imunologice
4. Sublinierea rolului neoangiogenezei în procesul de progresie tumorală și importanța markerilor endoteliali CD34 și CD105 în evaluarea riscurilor. Aceștia sunt analizați pentru prima dată împreună în cancerul cervical.
5. Includerea parametrilor imunologici și vasculari într-un cadru unitar, ce poate avea valoare practică pentru personalizarea conduitei terapeutice și dezvoltarea unor algoritmi de stratificarea riscului.

Consider că prin tematica aleasă, metodologia aplicată și interpretarea rezultatelor, această teză aduce un aport original și semnificativ la cunoașterea mai aprofundată a mecanismelor patogene ale cancerului cervical și încurajează perspectiva aplicării biomarkerilor în practica clinică curentă pentru un beneficiu sporit al pacientei.

REFERINȚE

1. Munteanu I, red. Tratat de Obstetrică. București: Editura Academiei Române; 2000, p. 23 - 25, 86-87
2. Lupu G., Anatomia omului – aparatul genital. În: Ispas AT, red București; Editura universitară „Carol Davila”; 2006, p. 93
3. Dallendach-Hellweg G, Knebel Doeberitz M von, Trunk MJ, Color Atlas of Histopathology of the Cervix Uteri. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, p. 13-31
4. Chhieng D, Hui P, Cytology and Surgical Pathology of Gynecologic Neoplasms. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 p. 1 – 2
5. Mills SE editor. Histology for Pathologists. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, p. 1017 – 1026
6. Konishi I, Fujii S, Nonogaki H, Nanbu Y, Iwai T, Mori T. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen, and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix. *Cancer* 1991 Sep 15; 68(6):1340-1350
7. Albores-Saavedra J, Gersell D, Gilks CB, et al. Terminology of endocrine tumors of the uterine cervix: results of a workshop sponsored by the College of American Pathologists and the National Cancer Institute. *Arch Pathol Lab Med.* 1997 Jan;121(1):34–9.
8. Fetissof F, Arbeille B, Boivin F, Sam-Giao M, Henrion C, Lansac J. Endocrine cells in ectocervical epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987 May;411(3):293–8.
9. Fetissof F, Berger G, Dubois MP, et al. Endocrine cells in the female genital tract. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1986;409(3):223–34.
10. Fetissof F, Heitzman A, Machet MC, Lansac J. Unusual endocervical lesions with endocrine cells. *Pathol Res Pract.* 1993;189:928–39.
11. Fetissof F, Serres G, Arbeille B, de Muret A, Sam-Giao M, Lansac J. Argyrophilic cells and ectocervical epithelium. *Int J Gynecol Pathol.* 1991;10:177–90.
12. Scully R, Aguirre P, DeLellis R. Argyrophilia, serotonin, and peptide hormones in the female genital tract and its tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 1984;3:51–70
13. Chan JK, Tsui WM, Tung SY, Ching RC. Endocrine cell hyperplasia of the uterine cervix. A precursor of neuroendocrine carcinoma of the cervix? *Am J Clin Pathol.* 1989;92:825–30

14. Hussain LA, Kelly CG, Fellowes R, et al. Expression and gene transcript of Fc receptors for IgG, HLA class II antigens and Langerhans cells in human cervico-vaginal epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1992;90:530–8
15. Miller CJ, McChesney M, Moore PF. Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. *Lab Invest*. 1992;67:628–34
16. Morelli AE, di Paola G, Fainboim L. Density and distribution of Langerhans cells in the human uterine cervix. *Arch Gynecol Obstet*. 1992;252:65–71
17. Osamura RY, Watanabe K, Oh M. Melanin-containing cells in the uterine cervix: histochemical and electron-microscopic studies of two cases. *Am J Clin Pathol*. 1980;74:239–42
18. International Agency for Research on Cancer. Cervix uteri fact sheet. *GLOBOCAN 2022* [Internet]. Lyon: IARC; 2022 [accesatiune 2024]. Disponibil la: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/23-cervix-uteri-fact-sheet.pdf>
19. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209–49
20. Zhou C, Wei W, Ma J, Yang Y, Liang L, Zhang Y, et al. Cancer-secreted exosomal miR-1468-5p promotes tumor immune escape via the immunosuppressive reprogramming of lymphatic vessels. *Mol Ther*. 2021;29:1512–28.
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424
22. Rayner M, Welp A, Stoler MH, Cantrell LA. Cervical cancer screening recommendations: now and for the future. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(16):2273.
23. International Agency for Research on Cancer. Romania fact sheet. *GLOBOCAN 2022* [Internet]. Lyon: IARC; 2022 [accesat in ianuarie 2024]. Disponibil la: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/642-romania-fact-sheet.pdf>
24. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:888–94
25. Institutul Național de Sănătate Publică. Analiza de situație privind cancerul de col uterin în România 2024 [Internet]. București: INSP; 2024 [accesat ianuarie 2024]. Disponibil la: <https://insp.gov.ro/wp-content/uploads/2024/01/Analiza-de-situatie-cancer-de-col-uterin-2024.pdf>
26. Societatea de Obstetrică și Ginecologie din România, Colegiul Medicilor din România. Ghid clinic – Cancerul de col uterin. Revizuit 2024. Anexa 8

27. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Cervical Cancer. Version 2.2019*. 2018 Oct 12
28. Cibula D, Pötter R, Planchamp F, Avall-Lundqvist E, et al. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology guidelines for the management of patients with cervical cancer. *Virchows Arch*. 2018 Jun;472(6):919–36
29. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin: diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;78(1):79
30. Herrington CS, Kim K-R, Kong CS, Longacre TA, McCluggage WG, Mikami Y, et al., editors. WHO classification of tumors. 5th ed. Lyon: IARC; 2020. Chapter 8
31. Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:613–25
32. Khosravi N, Mokhtarzadeh A, Baghbanzadeh A, Hajiasgharzadeh K, Shahgoli VK, Hemmat N, et al. Immune checkpoints in tumor microenvironment and their relevance to the development of cancer stem cells. *Life Sci*. 2020;256:118005
33. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J HistochemCytochem*. 2006;54:385–95
34. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *HistolHistopathol*. 2008 May;23(5):601–7. doi:10.14670/HH-23.601
35. Hays P. Artificial intelligence in cytopathological applications for cancer: a review of accuracy and analytic validity. *Eur J Med Res*. 2024;29:553
36. Agrawal T, Bhawal A, Ganapathy K. The Meta-Analysis AI in Cervical Cancer Detection and Diagnosis. 2023;:1264–9
37. Wang J, Yu Y, Tan Y, Wan H, Zheng N, He Z, et al. Artificial intelligence enables precision diagnosis of cervical cytology grades and cervical cancer. *Nat Commun*. 2024 May 22;15(1):4369
38. Butte AJ, Chen D. Translational bioinformatics for genomic medicine. In: Ginsburg GS, Willard H, editors. *Genomic and personalized medicine*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2012
39. Breen J, Allen K, Zucker K, Adusumilli P, et al. Artificial intelligence in ovarian cancer histopathology: a systematic review. *NPJ Precis Oncol*. 2023;7:83
40. Zia S, Yildiz-Aktas IZ, Zia F, et al. An update on applications of digital pathology: primary diagnosis, telepathology, education and research. *DiagnPathol*. 2025;20:17
41. Hanna MG, Pantanowitz L. Digital pathology. In: Narayan R, editor. *Encyclopedia of biomedical engineering*. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 524–32

42. Zarella MD, Bowman D, Aeffner F, Farahani N, et al. A practical guide to whole slide imaging. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143:222
43. Chen ZE, Lin F. Overview of predictive biomarkers and integration of IHC into molecular pathology. In: Fan L, Jeffrey P, editors. *Handbook of practical immunohistochemistry: frequently asked questions*. 2nd ed. New York: Springer; 2015
44. Yong WH, Dry SM, Shabihkhani M. A practical approach to clinical and research biobanking. *Methods Mol Biol.* 2014;1180:137–62
45. Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and Geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138:1564–77
46. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 2014 Nov 29;9:221
47. An H, Ding L, Ma M, Huang A, Gan Y, Sheng D, et al. Deep learning-based recognition of cervical squamous intraepithelial lesions. *Diagnostics (Basel).* 2023 May 12;13(10):1720
48. Joshua A, Allen KE, Orsi NM. An overview of artificial intelligence in gynaecological pathology diagnostics. *Cancers.* 2025;17(8):1343
49. Tang H-P, Cai D, Kong Y-Q, Ye H, Ma Z-X, Lv H-S, et al. Cervical cytology screening facilitated by an artificial intelligence microscope: a preliminary study. *Cancer Cytopathol.* 2021;129(10):693–700
50. Lai B, Fu J, Zhang Q, Deng N, Jiang Q, Peng J. Artificial intelligence in cancer pathology: challenges to meet increasing demands of precision medicine. *Int J Oncol.* 2023;63(3):107
51. Baeten IGT, Hoogendam JP, Stathonikos N, Gerestein CG, Jonges GN, van Diest PJ, et al. Artificial intelligence-based sentinel lymph node metastasis detection in cervical cancer. *Cancers.* 2024;16:3619
52. van Diest PJ, Flach RN, van Doijeweert C, Makineli S, Breimer GE, Stathonikos N, et al. Pros and cons of artificial intelligence implementation in diagnostic pathology. *Histopathology.* 2024;84:924–34
53. Wu X-J, et al. Research on cervical cancer p16/Ki-67 immunohistochemical dual-staining image recognition algorithm based on YOLO. *arXiv [Preprint]*. 2024. Available from: <https://arxiv.org/abs/2412.01372>
54. Hasegawa T, et al. Identification and quantification of radiotherapy-related protein expression in cancer tissues using the QuPath software and prediction of treatment response. *In Vivo.* 2024;38(3):1470–6
55. International Ki67 in Breast Cancer Working Group. QuPath protocol for Ki67 IHC evaluation [Internet]. 2022 [citată 30 iulie 2025]. Available from: https://www.ki67inbreastcancerwg.org/wp-content/uploads/2022/11/QuPath-protocol-for-Ki67-IHC-evaluation_IWGKBC_ModPath.pdf

56. Acs B, Pelekanou V, Bai Y, Martinez-Morilla S, Toki M, Leung SCY, et al. Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. *Mod Pathol*. 2018 Sep;31(9):1242–52
57. Cruz-Ramos JA, Ramos-Márquez M, Correa-Santillan V, Farias-López M. Quantification of Ki-67 in cervical cancer through digital image analysis improves interobserver and intraobserver concordance. 2022
58. Fernezlian SM, et al. A semi-automated microscopic image analysis method for scoring Ki-67 nuclear immunostaining. *Braz J Med Biol Res*. 2023 Nov 13;56:e12922
59. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191–2194
60. Institutul Național de Sănătate Publică. Analiza de situație privind cancerul de col uterin în România 2024 [Internet]. București: INSP; 2024 [accesat ianuarie 2024]. Disponibil la: <https://insp.gov.ro/wp-content/uploads/2024/01/Analiza-de-situatie-cancer-de-col-uterin-2024.pdf>
61. Roma AA, Diaz De Vivar A, Park KJ, et al. Invasive endocervical adenocarcinoma: a new pattern-based classification system with important clinical significance. *Am J Surg Pathol*. 2015 May;39(5):667–72
62. Diaz De Vivar A, Roma AA, Park KJ, et al. Invasive endocervical adenocarcinoma: proposal for a new pattern-based classification system with significant clinical implications: a multi-institutional study. *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Nov;32(6):592–601