

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DERMATO-VENEROLOGIE**

***Utilizarea microscopiei confocale de reflectanță in vivo și a
dermatoscopiei în determinarea preoperatorie a
subtipurilor histopatologice de carcinom bazocelular***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GIURCĂNEANU CĂLIN

Student doctorand:

LUPU MIHAI

2019

Cuprins

Introducere.....	5
I. PARTEA GENERALĂ	9
1. Morfofiziologia pielii	9
1.1. Morfologie macroscopică	9
1.2. Morfologie microscopică	9
1.3. Anexele cutanate.....	14
1.4. Vascularizația cutanată	16
1.5. Inervația cutanată	16
1.6. Funcțiile pielii	16
2. Carcinomul bazocelular	18
2.1. Definiție și istoric.....	18
2.2. Epidemiologie	19
2.3. Impactul carcinomului bazocelular asupra pacienților și sistemelor de sănătate	21
2.4. Etiopatogenie și factori de risc.....	23
2.5. Tablou clinic	28
2.6. Diagnostic	32
2.6.1. Importanța diagnosticului precoce	32
2.6.2. Examen clinic.....	36
2.6.3. Biopsia punch.....	37
2.6.4. Histopatologie	38
2.6.5. Imunohistochimie.....	44
2.6.6. Genetică și proteomică	45
2.7. Diagnostic diferențial.....	46
2.8. Tratament	47
2.9. Evoluție, prognostic, prevenție	54
3. Metode imagistice de diagnostic neinvaziv al carcinomului bazocelular	56
3.1. Dermatoscopia	56
3.1.1. Istoric.....	56
3.1.2. Dermatoscopia în diagnosticul carcinomului bazocelular	57
3.2. Ultrasonografia cutanată de înaltă frecvență.....	57
3.3. Tomografia de coerență optică	58
3.4. Imagistica în domeniul Terahertz	59
3.5. Spectroscopia Raman.....	59
3.6. Microscopia confocală de reflectanță <i>in vivo</i>	60
3.6.1. Istoric.....	60
3.6.2. Recenzie sistematică a acurateții microscopiei confocale de reflectanță <i>in vivo</i> pentru diagnosticul de carcinom bazocelular	60
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	73
4. Ipoteză de lucru și obiective generale.....	73
5. Metodologia generală a cercetării.....	74

5.1. Dermatoscopia	74
5.1.1. Principii optice în dermatoscopie	74
5.1.2. Criterii dermatoscopice în diagnosticul carcinomului bazocelular	77
5.2. Microscopia confocală de reflectanță <i>in vivo</i>	78
5.2.1. Principiile optice ale microscopiei confocale de reflectanță	78
5.2.2. Aspecte practice în microscopia confocală de reflectanță	84
6. Situația epidemiologică a carcinomului bazocelular	92
6.1. Introducere	92
6.2. Pacienți și metodă	92
6.3. Rezultate	94
6.4. Discuții.....	116
7. Criterii dermatoscopice și de microscopie confocală de reflectanță <i>in vivo</i> pentru diagnosticul preoperator al subtipului histopatologic de carcinom bazocelular	124
7.1. Introducere	124
7.2. Pacienți și metodă	124
7.2.1. Criterii de includere.....	125
7.2.2. Criterii de excludere	125
7.2.3. Materiale speciale utilizate în studiu	126
7.2.4. Testul index (MCR)	126
7.2.5. Standardul de referință (“gold standard”)	127
7.2.6. Analiza datelor	128
7.2.7. Alcătuirea bazei de date	135
7.2.8. Analiza statistică a datelor colectate	135
7.3. Rezultate	136
7.4. Discuție	159
8. Evaluarea preoperatorie prin dermatoscopie și microscopie confocală de reflectanță <i>in vivo</i> a marginilor laterale de excizie ale carcinomului bazocelular	164
8.1. Introducere	164
8.2. Pacienți și metodă	164
8.2.1. Criterii de includere.....	165
8.2.2. Criterii de excludere	165
8.2.3. Materiale speciale utilizate în studiu	165
8.2.4. Investigațiile imagistice.....	166
8.2.5. Alcătuirea bazei de date	168
8.2.6. Analiza statistică a datelor.....	169
8.3. Rezultate	169
8.4. Discuții.....	181
9. Concluzii și contribuții proprii	184
9.1. Concluzii	184
9.2. Contribuții proprii	187
Bibliografie	190
Lista lucrărilor științifice publicate	220
Anexe	222

Introducere

Carcinoamele keratinocitare sunt cea mai răspândită formă de cancer în întreaga lume, prevalența lor depășind prevalențele însumate ale tuturor celorlaltor cancere [1]. Carcinomul bazocelular (CBC), cel mai reprezentativ membru al acestei categorii, este cea mai comună formă de cancer la populația Caucaziană. În ultimele decenii, ratele incidenței CBC în Europa au crescut constant cu 5% anual [2], datorită îmbătrânirii unei populații cu istoric personal de expunere cronică la radiații ultraviolete [3].

Incidența în creștere, scăderea vârstei de debut și creșterea prevalenței pentru CBC multiple se traduc prin costuri morale și materiale semnificative, CBC devenind astfel o problemă de sănătate publică la nivel mondial. Deși datele epidemiologice sunt esențiale pentru monitorizarea tendințelor și alocarea resurselor în sistemul sanitar, majoritatea țărilor (inclusiv România) omit CBC din registrele regionale sau naționale de cancer.

Având un grad relativ scăzut de malignitate prin rata mică de metastazare a fost pusă în discuție importanța stabilirii precoce a diagnosticului de CBC. Studiile recente [4] au identificat timpul de amânare a tratamentului și dimensiunile tumorale ca fiind singurii factori independenți de risc pentru metastazare [5]. Mai mult, dimensiunea tumorală influențează indirect costurile asociate tratamentului prin impactul asupra cadrului terapeutic și asupra complexității tehnicilor reconstructive. Pentru realizarea diagnosticului precoce au fost dezvoltate metode imagistice neinvazive, printre care și dermatoscopia și microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (MCR). Aceste metode cresc acuratețea diagnostică și reduc numărul exciziilor și biopsiilor în scop diagnostic, scăzând astfel morbiditatea și costurile materiale asociate diagnosticului și tratamentului CBC [6, 7].

Scopul principal al detectării precoce este reducerea morbidității și mortalității prin instituirea unui tratament eficient în stadiile incipiente, ameliorând astfel prognosticul. Unul dintre cei mai importanți factori decizionali în alegerea tratamentului optim al CBC, exceptând dimensiunea tumorală și localizarea anatomică, este reprezentat de subtipul histopatologic, determinat în prezent prin efectuarea unei biopsii punch [8]. O recenzie sistematică recentă a semnalat însă un dezacord substanțial între subtipul histopatologic determinat prin efectuarea unei biopsii punch comparativ cu cel determinat prin examinarea histologică a piesei de biopsie excizională [9]. Comparativ cu biopsia punch, MCR permite evaluarea întregii leziuni, reducând astfel șansele erorilor de prelevare.

În cazul pacienților cu indicație chirurgicală, scopul principal este îndepărtarea completă a leziunii neoplazice, cu un minim impact funcțional și estetic. În mod frecvent,

marginile laterale de excizie ale CBC nu pot fi apreciate în mod obiectiv, corelațiile dermatoscopice dovedindu-se relativ ineficiente [10]. Utilizarea unei abordări complementare prin două metode imagistice neinvazive (dermatoscopie și MCR) în determinarea preoperatorie a marginilor laterale de excizie ale CBC ar putea reduce numărul tumorilor excizate incomplet și impactul intervențiilor chirurgicale asupra capitalului de țesut indemn.

I. PARTEA GENERALĂ - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Morfofiziologia pielii

În cadrul acestui capitol sunt descrise elemente clasice de morfologie cutanată macro- și microscopică, cu abordarea ca entități separate a epidermului, joncțiunii dermo-epidermice, dermului, hipodermului și anexelor cutanate. Descrierea pornește de la nivel de țesut și merge până la nivelul componentelor celulare și stromale individuale, cu exemplificarea funcțiilor fiecărei componente, punând accent pe structurile de importanță deosebită pentru tema de cercetare. Sunt discutate de asemenea aspecte referitoare la vascularizația, inervația și funcțiile pielii.

2. Carcinomul bazocelular

Carcinomul bazocelular, o tumoră cutanată malignă de origine keratinocitară excepțional metastanzantă dar cu un semnificativ potențial invaziv local, demonstrează rate de incidență și prevalență în continuă creștere, devenind astfel o reală problemă de sănătate publică în întreaga lume. Heterogenicitatea clasificărilor clinice și histopatologice se dovedește contraproductivă, atât în cercetare cât și în practica curentă [11]. Atenuarea impactului său negativ atât asupra pacienților cât și asupra sistemelor de sănătate poate fi realizată prin detecția neinvazivă și tratamentul aplicat în fazele incipiente. În acest scop, examenul clinic s-a dovedit insuficient de precis, dermatoscopia și microscopia confocală de reflectanță *in vivo* fiind superioare. Tratamentul CBC diferă semnificativ în funcție de riscul tumoral, definit prin mulți factori clinici și histologici, și include mijloace neinvazive topice, terapii minim-invazive și metode chirurgicale.

3. Metode imagistice de diagnostic neinvaziv al carcinomului bazocelular

Dermatoscopia, cunoscută pentru utilitatea sa în diagnosticarea precoce a cancerelor de piele [12], a evoluat semnificativ de-a lungul deceniilor devenind în prezent cea mai utilizată metodă imagistică neinvazivă pentru examinarea *in vivo* a leziunilor cutanate. Studiile arată valori ridicate ale acurateței diagnostice a dermatoscopiei pentru diagnosticul CBC, precizia ei fiind dependentă de prezența pigmentării tumorale și de nivelul de experiență al examinatorului [13]. Criteriile dermatoscopice pentru diagnosticul CBC au fost revizuite și completate constant.

Nu există suficiente dovezi care să susțină utilizarea ultrasonografiei cutanate de înaltă frecvență, imagisticii în domeniul Terahertz și spectroscopiei Raman în diagnosticul *in vivo* al CBC [14]. Tomografia de coerență optică, cu toate variantele sale tehnice, și-a demonstrat în timp valoarea diagnostică în multiple studii, fiind o tehnică viabilă pentru diagnosticul *in vivo* al CBC [15], având însă dezavantajul unei rezoluții relativ scăzute.

Cu un istoric ce datează din anul 1957 [16], dovada diseminării MCR o reprezintă cele peste 600 de articole publicate, dintre care 500 descriu aplicații clinice ale acesteia, unele aparținând grupului nostru [17-20].

Am realizat o recenzie sistematică a acurateței microscopiei confocale de reflectanță pentru diagnosticul CBC ale cărei rezultate au implicații semnificative pentru pacienții ce suferă de carcinoame bazocelulare. Bazându-ne pe prevalența de 1,4% a CBC în Europa și considerând o cohortă ipotetică de 1000 de persoane, 14 dintre acestea vor suferi de un carcinom bazocelular. Utilizând microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (sensibilitate de 95% și specificitate de 92%), doar unul din cele 14 CBC ar trece neobservat iar 79 de pacienți ar fi tratați deși nu suferă de CBC. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* ar putea deveni o tehnică extrem de utilă în diagnosticul acestei tumori, deși nu a putut fi formulată o concluzie fermă datorită numărului relativ redus de studii disponibile și limitărilor metodologice ale acestora.

II. PARTEA SPECIALĂ - COTRIBUȚII PERSONALE

4. Ipoteză de lucru și obiective generale

Motivațiile cercetării au fost reprezentate de prevalența crescută și incidența în continuă creștere a CBC, importantul impact psihologic și economic al acestui cancer de piele, lipsa relativă a datelor sistematice la nivel național referitoare la epidemiologia și particularitățile clinico-patologice ale CBC (disponibile doar studii izolate, monocentrice), lipsa studiilor incorporând microscopia confocală de reflectanță în diagnosticul CBC la nivel național, precum și numărul mic de astfel de studii care să adere la criteriile STARD [21] la nivel internațional.

Studiul de față a fost axat pe trei direcții generale de cercetare: **(1)** un studiu epidemiologic de prevalență retrospectiv cu scopul obținerii de informații sistematice referitoare la configurațiile clinico-patologice și evolutive a CBC în arealul geografic de desfășurare, **(2)** un studiu retro-prospectiv controlat histopatologic plecat cu scopul determinării preoperatorii a subtipului histopatologic de CBC prin tehnici imagistice neinvazive și **(3)** un studiu prospectiv controlat histopatologic cu scopul delimitării precise a marginilor laterale de excizie în etapa preoperatorie a tratamentului chirurgical a carcinomului bazocelular.

5. Metodologia generală a cercetării

În acest studiu multicentric subiecții au fost înrolați în urma prezentării acestora în trei clinici de dermatologie din București: Clinica de Dermatologie Oncologică, Alergologie și Imunologie Clinică, Spitalul Universitar de Urgență „Elias”, București; Centrul Medical Med-As, București; Departamentul de Dermatologie, Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice „Prof. N. Paulescu”, București, în perioada Noiembrie 2018 - Mai 2019. În studiul epidemiologic au fost incluse toate cazurile de CBC confirmate histopatologic în Clinica de Dermatologie Oncologică, Alergologie și Imunologie Clinică, Spitalul Universitar de Urgență „Elias”, București și Centrul Medical Med-As, București, în perioada Aprilie 2014 - Aprilie 2019. Studiul, definit prin toate cele trei componente ale sale (descrise la capitolul 4), a fost aprobat de către Comisia de Etică a Cercetării Științifice a U.M.F. „Carol Davila” din București prin avizul nr. 185 din

26.12.2018. Ulterior prezentării, întrunirii criteriilor de includere în studiu și acceptării condițiilor de participare prin semnarea formularului de consimțământ informat, subiecții au fost supuși unui protocol de investigații imagistice neinvazive prin dermatoscopie și MCR, urmat de excizia chirurgicală a leziunilor sub anestezie locală. Piesele tegumentare excizate au fost apoi fixate în formol 10%, prelucrate și supuse examenului histopatologic la parafină.

6. Situația epidemiologică a carcinomului bazocelular

Acest studiu epidemiologic de prevalență retrospectiv își propune realizarea unui tablou epidemiologic, clinico-patologic și evolutiv al CBC în arealul geografic al Municipiului București, în perioada Aprilie 2014 - Aprilie 2019, evaluarea impactului afecțiunii asupra sistemului de sănătate și realizarea unui portret al pacientului diagnosticat cu CBC în arealul geografic al Municipiului București.

Criterii de includere: pacienți cu diagnostic de carcinom bazocelular confirmat histopatologic în perioada Aprilie 2014 - Aprilie 2019; pacienți ale căror foi de observație sau fișe electronice conțineau suficiente informații astfel încât includerea lor în studiu să fie relevantă. **Criterii de excludere:** pacienți ale căror foi de observație sau fișe electronice nu conțineau suficiente informații astfel încât includerea lor în studiu să fie relevantă. **Colectarea datelor:** informațiile colectate din bazele de date informatice și din foile de observație ale pacienților au cuprins: date demografice (sexul, vârsta, mediul de proveniență), condiții de viață și muncă, antecedente personale patologice, diagnostic clinic (formă clinică, localizare anatomică), informații cuprinse în buletinul de diagnostic histopatologic, tratamentul efectuat și după caz, data internării și cea a externării.

6.3. Rezultate

Au fost incluse în studiu 570 carcinoame bazocelulare provenind de la 422 de pacienți (47,86% femei și 52,14% bărbați), raportul bărbați/femei fiind de 1,08/1. Vârstele acestora au fost cuprinse în intervalul 27-92 ani, cu o vârstă medie la ambele sexe de $68,74 \pm 12,49$ ani. Diferența de 0,962 ani dintre mediile de vârstă pentru cele două sexe nu a fost semnificativă statistic ($p=0,43$). Deși bărbații au totalizat cu 42 mai multe tumori decât femeile (306 vs 264), această diferență nu a fost semnificativă statistic ($p=0,079$). Cea mai numeroasă grupă de vârstă, conținând 254 de pacienți, a fost cea de 60-79 ani. Cel mai tânăr pacient diagnosticat cu CBC a fost o femeie de 27 ani. Numărul total al tumorilor a

fluctuat între 01/04/2014 - 31/03/2018 însă, numărul de cazuri înregistrate în perioada 01/04/2018 - 31/03/2019 (N=153) a fost semnificativ mai mare decât în celelalte perioade ($p=0,001$). Nouăzeci și unu (21,6%) de pacienți au fost diagnosticați cu mai mult de o tumoră. Nu a fost identificată o asocieră între numărul tumorilor și sex ($p=0,544$). Am determinat existența unei tendințe liniare între prezența de tumori multiple și înaintarea în vârstă ($p<0,005$).

Au fost colectate informații referitoare la distribuția topografică a CBC în toate cele 570 de cazuri. În aproape jumătate din cazuri (47,5%) leziunile au fost localizate la nivelul feței, în special la nivelul nasului (10,8%). A doua cea mai frecventă localizare a fost la nivelul toracelui (148; 26%). În 49 (8,6%) din cazuri CBC erau prezente la nivelul capului și gâtului (cu excepția feței), în 47 (8,2%) la nivelul membrelor inferioare și în 38 (6,7%) la nivelul membrelor superioare. Cea mai puțin frecventă localizare a fost la nivelul abdomenului (3%). A existat o predilecție a CBC pentru zona feței indiferent de sex, cu 134 (50,76%) CBC faciale la femei și 137 (44,77%) la bărbați. Majoritatea leziunilor localizate la nivelul feței (N=139) aparțineau pacienților mai vârstnici, între 60 și 79 ani ($p<0,005$). Localizarea la nivelul trunchiului a fost semnificativ mai frecventă ($p=0,009$) în rândul tinerilor (20-39 ani). Pacienții cu CBC al toracelui au fost, în medie, cu $5,95 \pm 1,65$ ani mai tineri decât cei cu CBC în zona feței ($p=0,016$). Analiza în dinamică a evidențiat o reducere semnificativă de 11,16% a CBC din zona feței împreună cu o creștere de 8,39% la nivelul trunchiului.

Distibuția globală a subtipurilor histopatologice ale CBC incluse în studiu a confirmat predominanța subtipului nodular (328/570). Celelalte subtipuri histopatologice în ordine descrescătoare a frecvenței au fost: superficial - 28,9% (165), infiltrativ (CBCi) - 8,4% (48), micronodular - 2,5% (14), bazoscuamos - 2,1% (12), sclerodermiform - 0,4% (2) și fibroepitelial - 0,2% (1). CBCn a fost de departe cel mai frecvent subtip histopatologic atât la femei cât și la bărbați (54,55% din CBC la femei și 60,13% din CBC la bărbați). Nu au fost determinate asocieri între subtipul histopatologic și sexul pacienților ($p=0,057$). Pacienții cu CBC micronodular, bazoscuamos și sclerodermiform au fost, în medie, mai în vârstă decât restul pacienților. Pacienții cu CBCs au fost semnificativ mai tineri decât cei cu CBCn și cei cu subtipuri agresive de CBC ($p=0,043$). CBCn a fost subtipul dominant în zona feței, capului și gâtului (65,6% dintre CBCn). CBCs a fost subtipul dominant la nivelul trunchiului (46,1% dintre CBCs). Dintre CBCi, 89,6% au fost localizate la nivelul feței, capului și gâtului. Numărul CBCn și CBCs a crescut semnificativ în timp, în timp ce subtipurile infiltrativ și bazoscuamos au înregistrat o scădere în

dinamică. Au existat diferențe minime (și ne semnificative statistic) între mediile diametrului tumoral maxim între bărbați și femei, la nivelul diferitelor regiuni anatomice. Datele confirmă o relație pozitivă aproape liniară între diametrul tumoral maxim și gradul de agresivitate al subtipului histopatologic.

Per total, fără a ține cont de topografia lezională și de subtipul histopatologic, profunzimea invaziei tumorale a fost, în ordine descrescătoare a frecvenței: derm reticular (77,25%), joncțiune dermo-epidermică (13,2%), strat muscular (3,37%), derm papilar și hipoderm (2,81%) și perineural (0,56%). Invazia stratului muscular a fost prezentă doar în cazul subtipurilor nodular (2,53%), infiltrativ (0,56%) și bazoscuamos (0,28%). Invazia perineurală, prezentă în 0,56% din toate cazurile, indiferent de regiunea anatomică, a fost constatată doar pentru subtipurile nodular și micronodular. Analiza datelor dezvăluie o creștere progresivă a mediei valorii diametrului tumoral maxim odată cu înaintarea în profunzime a tumorii ($p < 0,05$).

Doar 2,3% ($N=13$) dintre CBC au reprezentat recidive tumorale. Opt dintre aceste recidive au fost prezente la femei și doar 5 la bărbați ($p=0,265$). Pacienții ale căror tumori reprezentau recidive au fost, în medie, cu 3,25 ani mai în vârstă decât cei cu tumori primare ($p=0,384$). Majoritatea recidivelor tumorale au fost prezente la nivel facial ($N=11$) și doar câte una la nivelul trunchiului și membrelor inferioare, respectiv ($p=0,02$). Subtipurile histopatologice ale tumorilor recidivante au fost, în ordine descrescătoare a frecvenței lor: nodular ($N=6$), infiltrativ ($N=5$) și superficial ($N=2$) ($p=0,013$). Diametrul maxim al recidivelor tumorale a fost, în medie, cu $0,258 \pm 0,09$ cm mai mic decât cel al tumorilor primare ($p=0,019$). Cross-clasificarea cazurilor în funcție de criteriile NCCN [22] a demonstrat că 41,92% din tumorile din lotul nostru s-au încadrat în categoria de risc înalt.

Cele două măsuri ale impactului CBC asupra sistemului sanitar au fost considerate cadrul îngrijirilor medicale (internare continuă sau internare de zi/vizită în ambulatoriu) și numărul zilelor de spitalizare. Numărul pacienților tratați în regim spitalizare de zi/ambulatoriu a fost semnificativ mai mare ($p < 0,005$) decât al celor internați continuu (302 vs. 120). Pacienții din lotul nostru au primit, în medie, 1,75 zile de îngrijiri medicale. O corelație slabă, dar semnificativă statistic a fost prezentă între vârsta pacienților și numărul de zile de îngrijiri medicale ($r=0,107$; $p=0,028$). Pacienții ce au prezentat tumori multiple au necesitat, în medie, cu 0,5 mai multe zile de îngrijiri medicale decât cei ce au prezentat o singură tumoră ($p=0,024$). A fost observată o corelație slabă între numărul zilelor de îngrijiri medicale și diametrul tumoral maxim ($r=0,136$; $p=0,006$). Pacienții ce

prezentau CBCi au necesitat, în medie, cu 0,88 ($p=0,027$) și 1,12 ($p<0,005$) zile de îngrijiri medicale mai mult decât cei cu CBCn respectiv CBCs. Analiza a arătat că pacienții ce asociau boli cardiovasculare aveau de 3,789 ori șanse mai mari de a fi tratați în regim de spitalizare continuă față de ceilalți pacienți ($p<0,005$). Prin contrast, un pacient cu diabet zaharat tip 2 avea șanse 2,044 ori mai mari de a fi tratat în regim de spitalizare de zi/ambulatoriu ($p=0,029$).

6.4. Discuții

Multiple studii [23-25] confirmă tendința ascendentă a prevalenței CBC, pentru toate grupele de vârstă, demonstrată în studiul nostru. Vârsta înaintată și sexul masculin sunt caracteristici intrinseci cunoscute ca fiind factori favorizanți ai dezvoltării CBC [26, 27]. Raportul bărbați/femei de 1,08 arată o predilecție a CBC pentru sexul masculin, date susținute de studii anterioare [27, 28]. Vârsta medie a pacienților de $68,74 \pm 12,49$ ani demonstrează riscul crescut pentru CBC al vârstnicilor. Vârsta înaintată la primul CBC, sexul masculin și istoricul personal sau familial pozitiv pentru CBC au fost asociate cu CBC multiple [29, 30]. Deși nu am identificat o asociere semnificativă între prezența tumorilor multiple și sexul pacienților, am evidențiat o tendință liniară semnificativă statistic între înaintarea în vârstă și prezența de CBC multiple. Distribuția topografică a leziunilor în cohorta analizată este concordantă cu datele din literatură [31, 32]. Se observă o reducere semnificativă în timp a tumorilor din zona feței (-11,16%) și o creștere a numărului lor la nivelul trunchiului (8,39%), tendințe coroborate și de alte studii [31, 32]. Creșterea proporției de CBC la nivelul trunchiului și scăderea ei în zona feței în lotul nostru ar putea fi rezultatul schimbării comportamentului de expunere la radiații UV, printr-o atenție sporită acordată protecției feței. Studiul nostru confirmă diferențele între caracteristicile fundamentale ale diferitelor subtipuri histopatologice de CBC [24, 25, 33]. Predominanța subtipului superficial la pacienții mai tineri este confirmată în multiple studii observaționale [25, 28, 34]. Tumorile mixte, incluzând mai mult de un singur subtip histopatologic, nu au fost analizate în studiul prezent. Deși des întâlnite, frecvența acestora depinde în mare măsură de sistemul de clasificare utilizat. Fiind un studiu multicentric, analiza acestora ar fi suferit prin heterogenicitate accentuată.

Contrar studiilor anterioare [35], datele noastre arată diferențe minime și ne semnificative statistic ale dimensiunilor tumorale între diferitele regiuni anatomice și între sexe, fără conexiuni semnificative cu vârsta pacienților. Pe de altă parte, a fost evidențiată o relație aproape liniară între media diametrului tumoral maxim și agresivitatea

subtipului histopatologic, precum și diferențe semnificative între subtipuri în ceea ce privește grosimea tumorală medie, asociere semnalată și în cadrul altor studii [35]. În toate regiunile anatomice, subtipurile histopatologice agresive ale CBC au invadat structuri mai profunde, observație confirmată și în alte studii [36, 37].

În conformitate cu studiile anterioare [38], nu am identificat diferențe semnificative între numărul de tumori recidivante la bărbați comparativ cu femeile. Pacienții cu CBC recidivante din studiul nostru sunt cu 3,25 ani mai în vârstă decât cei cu tumori primare, fără semnificație statistică [38]. Analiza riscului tumoral al CBC conform ghidurilor NCCN [22] a încadrat 41,92% (239/570) dintre tumorile evaluate în clasa de risc înalt.

Tipul cadrului de îngrijiri medicale nu a fost influențat de vârsta pacienților, numărul de tumori, subtipul histopatologic sau profunzimea invaziei tumorale. Vârstele înaintate și diametrul tumoral maxim sunt asociate cu un număr mai mare de zile de îngrijiri medicale. De asemenea, prezența tumorilor multiple și a subtipului infiltrativ a determinat creșterea numărului de zile de îngrijiri medicale.

7. Criterii dermatoscopice și de microscopie confocală de reflectanță *in vivo* pentru diagnosticul preoperator al subtipului histopatologic de carcinom bazocelular

Unul dintre cei mai importanți factori decizionali în alegerea tratamentului optim al CBC, exceptând dimensiunile tumorale și localizarea anatomică, este reprezentat de subtipul histopatologic [8, 39]. Studiul își propune validarea de criterii dermatoscopice și confocale specifice fiecărui subtip histopatologic de CBC și determinarea valorilor predictive de subtip ale acestora, stabilirea gradului de acord între observatori independenți și intra-observator a criteriilor dermatoscopice și confocale specifice și a prezenței CBC prin cele două mijloace imagistice neinvazive.

Acest studiu retro-prospectiv controlat histopatologic a inclus pacienți ce s-au prezentat în oricare din cele trei centre de desfășurare, în perioada Noiembrie 2018 - Mai 2019. Dimensiunea lotului de leziuni a fost calculată astfel: $TP + FN = Z^2 \times \frac{SN(1-SN)}{W^2}$, cu TP (real pozitivi), FN (fals negativi), Z (valoarea distribuției CI; 95% CI = 1,96), W (precizia) [40]. Estimând o prevalență a bolii de 75% în rândul pacienților eligibili și o sensibilitate de 90% a testului index, pentru o precizie de 5% a sensibilității și de 7% a

specificității, cu intervalele de încredere fixate la 95%, am calculat un număr total necesar de 186 de leziuni.

Criterii de includere: a) Pacienți cu vârsta peste 18 ani în momentul recrutării; b) Existența unei suspiciuni clinice de carcinom bazocelular; c) Pacienți ce au fost de acord cu condițiile desfășurării studiului și care au semnat formularul de consimțământ informat; d) Pacienți ce puteau să adere la și să îndeplinească cerințele specifice studiului. **Criterii de excludere:** a) Orice pacient înrolat într-un alt studiu în momentul prezentării sau în ultimele 30 zile; b) Existența unei comorbidități care, conform investigatorului, l-a exclus din participarea la studiu; c) Tumori reziduale sau recurențe tumorale după tratamente chirurgicale; d) Tumori tratate anterior includerii în studiu prin crioterapie sau alte metode ablativă; e) Tumori tratate anterior includerii în studiu prin terapie topică (ex: imiquimod, ingenol mebutate, 5-Fluorouracil, etc); f) Tumori tratate anterior includerii în studiu prin terapie fotodinamică sau radioterapie; g) Tumori suprapuse sau în proximitatea unor cicatrici, tatuaje sau cu extindere la nivelul unei suprafețe mucoase; h) Prezența de grade superioare de handicap; i) Pacienți cu leziuni tegumentare în regiuni anatomice desemnate de către investigatori ca fiind neadecvate pentru studiul imagistic utilizând tehnicile specifice studiului.

Materialele speciale utilizate în studiu au inclus dermatoscop Heine Delta 20T (Heine Optotechnik, Herrsching, Germany), aparat foto DSLR D80 (Nikon, Japan), cameră dermatoscopie VivaCam (Caliber ID, Henrietta, NY, U.S.A.; MAVIG GmbH, München, Germany), microscop confocal de reflectanță VivaScope 1500 (Caliber ID, Henrietta, NY, U.S.A.; MAVIG GmbH, München, Germany). Au fost înregistrate date anamnestice (vârstă, sex, factori de risc, comorbidități relevante), caracteristici clinice, date de imagistică (imagini clinice, dermatoscopice și de microscopie confocală de reflectanță).

Testul index. Investigațiile imagistice de dermatoscopie și MCR au fost realizate în Centrul Medical Med-As București și în cadrul Institutului Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice “Prof. N. Paulescu”, București cu ajutorul aceluiași model de dermatoscop și microscop confocal de reflectanță, de către doi investigatori diferiți cu experiență în dermatoscopie și MCR (ML și CC), urmând același protocol imagistic.

Standardul de referință. Ulterior investigațiilor imagistice s-a practicat biopsia excizională cu margini de siguranță a leziunilor investigate. Toate piesele tegumentare excizate au fost procesate după protocolul standard prin fixare în formol 10%, includere la parafină, secționare și colorare cu hematoxin-eozină. Subtipul histopatologic de carcinom bazocelular a fost consemnat pentru fiecare caz și au fost realizate imagini reprezentative

ale lamelor de histopatologie. Subtipurile histopatologice au fost definite conform clasificării Rippey [41] simplificată. Pentru scopurile acestui studiu subtipurile histopatologice au fost definite astfel: nodular, superficial și agresiv (CBCa) (infiltrativ, micronodular și bazoscuamos). Sursa secundară de colectare a datelor a fost reprezentată de arhivele electronice existente în 2 din cele 3 centre de desfășurare a studiului: Centrul Medical Med-As București și Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice “Prof. N. Paulescu”.

Analiza datelor. Imaginile obținute în urma examinărilor dermatoscopice, de microscopie confocală de reflectanță și ale lamelor de histopatologie au fost prelucrate, anonimizate, randomizate, apoi interpretate de către un evaluator cu experiență în MCR în doi timpi (momentul inițial și 2 săptămâni mai târziu) și doi evaluatori începători în MCR ”în orb”, fără ca aceștia să cunoască rezultatele examenului histopatologic. Înaintea începerii studiului, Lupu Mihai (investigator principal), a urmat un curs de o săptămână în utilizarea și interpretarea microscopiei confocale de reflectanță la Universitatea din Modena și Reggio Emilia, în Italia.

Criteriile dermatoscopice predefinite [42, 43] au fost: vase arborizante, cuiburi ovoide albastre-gri, semi-transluciditate, vase subțiri arborizante, globuli, zone astructurale roșii-albe translucid-opace, ulcerăție, multiple eroziuni de mici dimensiuni, puncte negre, structuri foliacee / „în frunză de arțar”, structuri „în spițe de roată”, structuri concentrice, vase punctiforme și pattern crisalix.

Criteriile confocale predefinite [7, 42] au fost: ulcerăție, atipii keratinocitare, streaming epidermic, insule tumorale mici (diametru $<300\ \mu\text{m}$), insule tumorale mari (diametru $>300\ \mu\text{m}$), cordoane conectate cu epidermul, siluete hiporefractile, palisadare periferică, clefting, hipervascularizație, structuri „în foi de ceapă” ce corespund chisturilor milia-like, fibre de collagen îngroșate dispuse peritumoral, celule inflamatorii (puncte strălucitoare și celule strălucitoare mai mari, ce corespund limfocitelor și melanofagelor, respectiv), celule dendritice în interiorul maselor tumorale (ce corespund melanocitelor).

Analiza statistică. Testele statistice utilizate au fost: Chi-pătrat, t-test, ANOVA, regresia logistică univariată și multivariată (RLM), analiza discriminativă, Cohen și Fleiss kappa. Au fost excluse din studiu leziunile care nu au fost excizate chirurgical (motivele au fost consemnate). Am considerat rezultatele MCR neconcludende ca fiind test pozitive și am inclus în analiză cazurile pentru care a existat standard de referință (N=2). Numărul de real și fals pozitivi și negativi au fost înregistrate. Am determinat sensibilitatea, specificitatea, likelihood ratio pozitiv și negativ și valoarea predictivă pozitivă și negativă a

diagnosticului CBC prin MCR și dermatoscopie utilizând tabele de contingență 2×2 . Acuratețea globală a fost calculată astfel: $Acurate\text{te globală} = Sensibilitate \times Prevalen\text{ță} + Specificitate \times (1 - Prevalen\text{ță})$ [44]. Pentru analiza statistică a datelor au fost utilizate pachetele software IBM SPSS v20 (IBM, New York, USA) și R [45].

7.3. Rezultate

În analiza finală au fost incluse 186 de leziuni, aparținând a 133 de pacienți (56 bărbați și 77 femei) cu vârstă medie de $69,12 \pm 12,82$ (mediană 70, IQR=16) ani și durată mediană a bolii de 2 ani (IQR=4). Grupul pacienților cu diagnostic de CBC confirmat histopatologic a inclus 108 subiecți (47 bărbați și 61 femei) cu vârstă medie de $69,57 \pm 11,21$ (mediană 70, IQR=13) ani și durată mediană a bolii de 2 ani (IQR=3,25). Șaptezeci și unu (82,6%) de pacienți erau nefumători și doar 15 (17,4%) fumau. Dintre cei 108 pacienți cu 156 de CBC confirmate histopatologic, 82,4% (N=89) prezentau o singură tumoră și doar 11,7% (N=19) prezentau CBC multiple. Cele mai multe dintre leziuni erau de subtip nodular (N=101; 64,7%), 18 (11,5%) erau CBC agresive (11 infiltrative, 4 micronodulare, 3 bazoscuamoase). Distribuția topografică a celor 156 de CBC a fost, în ordine descrescătoare, următoarea: cap și gât, inclusiv față (N=88), torace (N=48), membre superioare (N=12), membre inferioare (N=5) și abdomen (N=3). CBCs au fost plane în 25 din cele 37 de cazuri (67,6%) și elevate în 12 cazuri (32,4%); CBCn au fost elevate sau nodulare în majoritatea cazurilor (90/101; 89,1%) și plane în 11 cazuri (10,9%); CBCa au fost elevate în 9 cazuri (50%), plane în 7 cazuri (38,9%) și nodulare în 2 cazuri (11,1%). Diametrul tumoral maxim, măsurat *in vivo*, al carcinoamelor bazocelulare a avut o mediană de 11,43 mm (IQR=7,8) și a variat între 3,4 - 79,4 mm. În urma cross-clasificării pentru parametrii de evaluare a riscului tumoral, a reieșit că aproape jumătate (N=73; 46,8%) din CBC incluse în studiu se aflau în categoria de risc înalt. Numărul leziunilor incluse în studiul nostru (N=186) a fost suficient de mare pentru calcularea sensibilității și specificității cu o eroare maximă de estimare de 5% și respectiv 7%, cu un interval de încredere de $1 - \alpha = 0,95$ (95%). Timpul median între examinarea leziunilor prin MCR/dermatoscopie și tratamentul chirurgical a fost de 18 zile.

Diagnosticul dermatoscopic de carcinom bazocelular. În lotul nostru de 186 de leziuni, dermatoscopia a detectat prezența CBC cu o sensibilitate de 75% (95% CI 67,45; 81,58) și o specificitate de 63,33% (95% CI 43,86; 80,07), prevalența afecțiunii fiind de 83,87%. Acuratețea globală a dermatoscopiei pentru diagnosticul preoperator al CBC a fost de 73,12% (95% CI 66,14; 79,34).

Evaluarea criteriilor dermatoscopice pentru clasificarea CBC în subtipuri

histopatologic. În cazul CBCs, dermatoscopia a dezvăluit prezența de arii centrale roșii-albe (28/37) și vase subțiri arborizante (24/37), multiple eroziuni de mici dimensiuni (16/37) și puncte negre (14/37). Elementele dermatoscopice caracteristice pentru CBCn au fost vasele arborizante subțiri (71/101) și cele arborizante groase (49/101), semitransluciditatea (61/101), ulcerația vizibilă dermatoscopic (45/101) și cuiburile ovoide albastre-gri (37/101). CBCa au fost caracterizate prin prezența dermatoscopică a vaselor subțiri arborizante (13/18), ulcerației (12/18), vaselor punctiforme (8/18) și ariilor centrale roșii-albe (7/18).

Regresia logistică a criteriilor dermatoscopice pentru diagnosticul de subtip histopatologic al CBC. Am introdus toate cele 14 criterii dermatoscopice într-un model RLM cu eliminare retrogradă în funcție de likelihood ratio și un prag al clasificării de 0,5. Au fost create modele separate pentru fiecare subtip histopatologic. Deși vasele arborizante și cuiburile ovoide albastre-gri au fost puternic asociate cu CBCn la analiza univariată, acest efect a fost mult diminuat sub influența celorlalte variabile în modelul multivariat. Multiplele mici eroziuni, structurile foliacee și structurile concentrice au fost predictorii buni pentru subtipul superficial doar în analiza univariată, fiind depășite ca importanță de prezența ariilor centrale alb-roșii în analiza multivariată. În cazul CBCa, vasele punctiforme au fost un predictor puternic atât în analiza univariată, dar mai ales în cea multivariată.

Analiza discriminativă multiplă a criteriilor dermatoscopice pentru diagnosticul de subtip histopatologic al CBC. Ambele funcții discriminative obținute în urma analizei discriminative multiple au avut putere de discriminare semnificativă ($\Lambda = 0,435$, $\chi^2(28) = 121,964$, $p < 0,001$). În prima funcție, care a discriminat CBCn de CBCs, cel mai important criteriu a fost ariile centrale roșii-albe (0,592). În cea de-a doua funcție, care a discriminat CBCa de CBCs, cele mai importante criterii au fost semi-transluciditatea (0,603), ulcerația (-0,357) și vasele sangvine punctiforme (-0,546).

Diagnosticul de carcinom bazocelular prin microscopie confocală de reflectanță.

În lotul de 186 de leziuni, MCR a detectat prezența CBC cu o sensibilitate de 97,44% (95% CI 93,57; 99,30) și o specificitate de 83,33% (95% CI 65,28; 94,36), prevalența afecțiunii fiind de 83,87%. Acuratețea globală a MCR pentru diagnosticul preoperator al CBC a fost de 95,16% (95% CI 91,01; 97,76). În cazul includerii doar a cazurilor concludente la examinarea MCR (N=184), sensibilitatea a crescut la 97,44% (95% CI 93,57; 99,30) și specificitatea a crescut la 89,29% (95% CI 71,77; 97,73), la o prevalență de 84,78%.

Acuratețea globală a MCR pentru diagnosticul preoperator al CBC în cadrul acestui scenariu a fost de 96,2% (95% CI 92,32; 98,46).

Evaluarea criteriilor confocale pentru clasificarea CBC în subtipuri histopatologice. În cazul CBC superficial, examinarea MCR a dezvăluit prezența cordoanelor tumorale conectate cu epidermul (24/37), palisadării periferice (22/37) și structurilor dendritice în interiorul insulelor tumorale (18/37). Elementele caracteristice pentru CBC nodular au fost insulele tumorale mari (77/101) cu palisadare periferică (59/101), cleftingul peritumoral (51/101), hipervascularizația (68/101) și fibrele de collagen peritumoral (41/101). CBCa au fost caracterizate de prezența siluetele hiporefractile (10/18), palisadării periferice (8/18) și ulcerăției (8/18). Atipiile keratinocitare, streaming-ul epidermic și inflamația au fost egal reprezentate în toate subtipurile histopatologice.

Regresia logistică a criteriilor confocale pentru diagnosticul de subtip histopatologic al CBC. Am recurs atât la regresia logistică uni- cât și multivariată pentru a evalua influența criteriilor confocale asupra clasificării CBC. Deși insulele tumorale mari și hipervascularizația au fost puternic predictive pentru CBCn la analiza univariată, acest efect a fost diminuat sub influența celorlaltor variabile în modelul multivariat. Cordoanele conectate la epiderm și-au păstrat capacitatea înaltă de predicție pentru subtipul superficial și în modelul multivariat. În cazul CBCa, siluetele hiporefractile au fost un predictor puternic atât în analiza univariată, dar mai ales în cea multivariată.

Analiza discriminativă multiplă a criteriilor confocale pentru diagnosticul de subtip histopatologic al CBC. Ambele funcții obținute în urma analizei discriminative multiple au avut putere de discriminare semnificativă ($\Lambda = 0,548$, $\chi^2(28) = 87,996$, $p < 0,001$). În prima funcție, care a discriminat CBCn de CBCs, cele mai importante criterii confocale au fost cordoanele conectate la epiderm (-0,474), insulele tumorale mari (0,426) și hipervascularizația (0,392). În cea de-a doua funcție, care a discriminat CBCa de CBCs, cele mai importante criterii au fost siluetele hiporefractile (-0,732), cordoanele conectate la epiderm (0,448), insulele tumorale mici (-0,456) și hipervascularizația (0,418).

Acordul interobservator. Acordul inter-observator privind prezența CBC la examinarea MCR a fost moderat (Fleiss $\kappa=0,502$ [95% CI 0,42-0,584], $p<0,001$), în timp ce acordul la dermatoscopie a fost satisfăcător (Fleiss $\kappa=0,272$ [95% CI 0,19-0,354], $p<0,001$). Un grad de acord satisfăcător-moderat a fost obținut pentru majoritatea criteriilor, cu excepția ulcerăției, în cazul căreia acordul a fost bun ($\kappa=0,727$). Acordul inter-observator în cazul criteriilor MCR a fost în mare parte satisfăcător-moderat. În cazul cordoanelor conectate la epiderm, ulcerăției și hipervascularizației acordul a fost moderat,

în timp ce pentru insulele tumorale mari a fost obținut un acord inter-observator bun ($\kappa=0,642$; $p<0,001$).

Acordul intraobservator. Acordul intra-observator privind prezența CBC la examinarea dermatoscopică și MCR în cazurile analizate a fost de 91,39% și respectiv 94,62%. Analiza noastră a arătat un acord intraobservator foarte bun atât în cazul MCR ($\kappa=0,816$ [95% CI 0,707-0,925], $p<0,001$) cât și în cazul dermatoscopiei ($\kappa=0,801$ [95% CI 0,709-0,893], $p<0,001$).

Efecte adverse ale testului index și standardului de referință. Nu au fost observate efecte adverse în urma examinărilor prin dermatoscopie și MCR. Efectele adverse în urma exciziei chirurgicale au afectat 8 pacienți prin infecții postoperatorii ale plăgilor. Toate aceste cazuri au fost tratate cu antibioterapie orală, fără a fi necesară spitalizarea. Nu au existat efecte adverse grave.

7.4. Discuție

Managementul diferențiat al CBC în funcție de subtipul histopatologic [8] devine tot mai relevant odată cu creșterea numărului terapiilor neinvazive. Precizia determinării subtipului histopatologic al CBC prin intermediul biopsiilor punch sau incizionale este însă pusă la îndoială în literatură [9]. Caracteristicile demografice ale lotului studiat nu diferă semnificativ de cele ale lotului mult mai mare de pacienți al studiului epidemiologic desfășurat la capitolul 6 al acestei lucrări.

Studiul nostru demonstrează o sensibilitate și specificitate de 75% și respectiv 63,33% a dermatoscopiei pentru diagnosticul CBC, indiferent de subtip histopatologic. Datele din literatură arată valori mai ridicate ale sensibilității și specificității dermatoscopiei pentru diagnosticul CBC (80-90%) [13], însă în majoritatea acestor studii examinarea dermatoscopică este realizată de către experți mondiali în dermatoscopie. În studiul nostru semi-transluciditatea și globulii brun-negri s-au dovedit criterii bune de discriminare a CBCn, ariile centrale alb-roșii, punctele negre și absența ulcerăției au discriminat bine, în modelul nostru statistic, CBCs, în timp ce, vasele punctiforme s-au asociat cu o frecvență crescută a subtipurilor agresive ale CBC.

Studiile anterioare ce evaluează utilitatea MCR în diagnosticul CBC estimează valori ale sensibilității și specificității cuprinse între 85%-97% și respectiv 89-99% [46]. Rezultatele studiului nostru confirmă valorile ridicate ale sensibilității (97,44%) și specificității (83,33%) MCR pentru diagnosticul CBC, indiferent de subtip histopatologic. Criteriile confocale asociate cu CBC au fost descrise anterior de numeroși autori [47][7,

17, 48-54]. Studiul nostru arată diferențe semnificative între pattern-urile confocale ale subtipurilor histopatologice ale CBC, confirmând valoarea informațiilor morfologice furnizate de MCR și sugerând utilitatea sa în diagnosticul și clasificarea preoperatorie de subtip a CBC și confirmând datele deja disponibile referitoare la utilizarea MCR în diagnosticarea și stabilirea subtipurilor histologice de CBC [7, 42, 55]. În primul rând, cordoanele conectate la epiderm au fost cel mai puternic predictor pentru subtipul superficial, aspect susținut și de studiile anterioare [42]. CBCn a fost caracterizat de prezența insulelor tumorale mari, fibrelor de collagen peritumoral și hipervascularizației. Deși hipervascularizația a fost detectată în toate subtipurile tumorale din lotul studiat, în analiza multivariată aceasta a fost predictor doar pentru CBCn. Cordoanele conectate la epiderm au fost un factor de predicție negativ pentru CBCn, absența lor rezultând în șanse de 4 ori mai mici pentru acest subtip. CBC agresiv a fost caracterizat de prezența siluetei hiporefractile (55,5%). Mai mult, CBCa a fost cel mai frecvent subtip în absența hipervascularizației.

Rezultatele noastre arată un acord inter-observator moderat pentru prezența CBC prin examinare MCR și doar satisfăcător pentru examinarea dermatoscopică. Acordul intra-observator a fost foarte bun atât la examinarea MCR ($\kappa=0,816$, 95% CI [0,707-0,925], $p<0,001$) cât și în cazul dermatoscopiei ($\kappa=0,801$ [95% CI 0,709-0,893], $p<0,001$).

Din experiență proprie, investigarea unei leziuni cutanate prin MCR durează, în medie, 10-15 minute, durată ce optimizează parcursul pacientului de la prezentare până în blocul operator. Unul dintre principalele avantaje ale MCR este diagnosticul rapid și tratamentul neinvaziv al CBCs comparativ cu procedurile invazive dureroase precum biopsia cutanată, cu toate întârzierile aferente lor. În viitor, examinarea prin MCR ar putea înlocui biopsia cutanată efectuată anterior intervențiilor Mohs, reducând astfel timpii de așteptare, costurile și scutind pacientul de o procedură invazivă suplimentară.

8. Evaluarea preoperatorie prin dermatoscopie și microscopie confocală de reflectanță *in vivo* a marginilor laterale de excizie ale carcinomului bazocelular

Scopul principal al chirurgiei dermatologice este îndepărtarea completă a leziunii neoplazice cu un impact minim asupra aspectului estetic post-operator, mai ales la nivelul zonelor importante din punct de vedere estetic. Subtipurile histopatologice agresive ale CBC pot prezenta extensie subclinică a marginilor laterale, constituind principalul motiv al

exciziilor incomplete și recidivelor tumorale post-operatorii. În prezent, marginile laterale de excizie ale CBC nu pot fi apreciate în mod obiectiv de către chirurg, corelațiile dermatoscopice dovedindu-se ineficiente [10]. Obiectivul principal al acestui studiu este de a evalua viabilitatea determinării pre-operatorii a marginilor laterale de excizie ale CBC prin dermatoscopie și MCR.

Acest studiu prospectiv controlat histopatologic a inclus pacienți ce s-au prezentat în oricare din cele 3 centre menționate anterior, în perioada Noiembrie 2018 - Mai 2019. Au fost înrolați doar pacienții care întruneau criteriile de includere în studiu și care și-au exprimat consimțământul pentru participarea la studiu. Datorită numărului limitat de studii adresate în mod specific problemei în cauză, dimensiunea lotului necesar a fost estimată la minim 10 leziuni.

Criteriile de includere și excludere, materialele speciale utilizate în studiu și cadrul investigațiilor imagistice neinvazive au fost identice cu cele prezentate la capitolul 7.

Investigațiile imagistice. Toate investigațiile imagistice au fost efectuate în cadrul Centrului Medical Med-As București. Marginile tumorale laterale au fost delimitate dermatoscopic și au fost marcate, prin incizii superficiale, la o distanță de 2 mm de tumoră. Ulterior, tegumentele de o parte și de cealaltă a inciziilor superficiale au fost explorate prin MCR pentru a determina prezența („margine MCR pozitivă” a corespuns prezenței de criterii confocale pentru CBC înafara inciziei sau la mai puțin de 2 mm de incizie pe partea cu tumora) sau absența („margine MCR negativă” a corespuns absenței criteriilor confocale pentru CBC înafara inciziei sau la mai mult de 2 mm de incizie pe partea cu tumora) invaziei tumorale. Distanțele incizie-tumoră au fost măsurate în trei puncte diferite și media aritmetică a acestora a fost notată. Toate leziunile examinate utilizând acest protocol imagistic au fost apoi excizate chirurgical de același investigator, în cadrul Centrului Medical Med-As, București. După confirmarea histopatologică a diagnosticului de CBC, a fost efectuat controlul marginilor de rezeecție prin secțiuni seriate în zonele cu incizii superficiale. Distanțele incizie-tumoră au fost măsurate pe imaginile histopatologice în trei puncte diferite și media aritmetică a acestora a fost notată.

Pentru **analiza statistică** a datelor au fost utilizate pachetele software SPSS v20 (IBM, New York, USA) și R [45].

8.3. Rezultate

Zece pacienți (4 bărbați și 6 femei) cu vârstă medie de $72,57 \pm 7,95$ (mediană 74, IQR=16) ani și durată mediană a bolii de 2 ani (IQR=2,88) au fost incluși în studiu. Din

punct de vedere clinic, trei (3/10) CBC au fost plane, șase (6/10) elevate și doar una (1/10) dintre leziuni a fost nodulară. Șase dintre leziuni au fost hipopigmentate, 2 parțial pigmentate și 2 pigmentate. Diametrul tumoral maxim măsurat *in vivo* (dermatoscopic) a avut o mediană de 10,82 mm (IQR=5,54) și a variat între 5,86 - 16,64 mm. Majoritatea leziunilor au fost localizate în zona capului și gâtului (N=8), urmată de torace (N=2). Cele mai multe dintre leziuni erau de subtip nodular (7/10), 2 erau superficiale și doar unul avea un subtip agresiv (micronodular). În urma cross-clasificării riscului tumoral, a reieșit că mai mult de jumătate (6/10) din CBC incluse în studiu se aflau în categoria de risc înalt. Timpul median scurs de la efectuarea investigațiilor de dermatoscopie și MCR până la excizia chirurgicală a leziunilor a fost de 4,5 zile (IQR=3).

În total, 10 tumori totalizând 17 margini au fost evaluate prin MCR. Două margini au fost distruse la procesare și prin urmare nu au putut fi analizate histopatologic, în analiza finală fiind incluse 15 margini. Un număr mediu de $1,5 \pm 0,53$ margini per leziune au fost evaluate prin MCR. Timpul mediu de examinare pentru fiecare margine a fost de aprox. 10 minute. Distanțele măsurate incizie-tumoră pe imaginile de MCR (N = 15) și cele de histologie (N=15) au fost utilizate pentru crearea unui model de regresie liniară ($F(1,5)=10,453$, $p=0,023$), corelația dintre perechile de valori fiind una puternică ($R=0,822$). Ecuația de regresie obținută a fost: *Distanța măsurată histopatologic* = $7,57 + 0,883 \times \text{distanța măsurată prin MCR}$. Reducerea procentuală a distanțelor incizie-tumoră măsurate histopatologic față de cele măsurate prin MCR a fost, în medie, de 11,96%. Sexul, vârsta și localizarea anatomică a leziunilor nu au influențat reducerea procentuală a distanțelor incizie-tumoră între MCR și histopatologie ($p=0,376$).

Sensibilitatea și specificitatea MCR pentru determinarea marginilor laterale de excizie în cazul CBC a fost de 33,33% (95% CI 0,84 - 90,57%) și respectiv 100% (95% CI 59,04 - 100). Acuratețea globală a MCR pentru determinarea marginilor laterale de excizie a CBC a fost de 80% (95% CI 44,39% - 97,48%).

8.4. Discuții

Deși elementele tumorale sunt identificate cu precizie la examinarea MCR, trasarea marginii identificate la MCR pe piele reprezintă o adevărată provocare. Am depășit obstacolul achiziției de imagine confocală într-o „cameră închisă” prin efectuarea de incizii superficiale ce au servit ca marker precis și stabil în timpul și după evaluarea prin MCR, care este în același timp detectabil și la examenul histopatologic de confirmare a diagnosticului [56]. Metodologiile studiilor anterioare ce utilizează această metodă [56, 57]

au de suferit datorită neglijării factorului de micșorare fizică a probelor de țesut [58] și consecutiv a distanțelor măsurate la examinarea histopatologică. Studiul nostru a luat în considerare acest fenomen, demonstrând prin două modele de regresie liniară o reducere a distanțelor incizie-tumoră între examinarea MCR și cea histologică. Sexul, vârsta și localizarea anatomică nu au influențat reducerea procentuală a distanțelor incizie-tumoră, observație confirmată de studii anterioare [58, 59]. Rezultatele noastre demonstrează precizia superioară a MCR în identificarea marginilor de excizie (acuratețe globală de 80%) comparativ cu evaluarea clinică și dermatoscopică. Această abordare complementară este potrivită mai ales în cazul CBC hipopigmentate frecvent caracterizate prin lipsa criteriilor dermatoscopice specifice [43, 60]. În ciuda dimensiunii reduse a lotului studiat, inciziile superficiale au putut fi detectate clinic și confocal în toate cazurile. Examinarea MCR a durat aprox. 10 minute pentru evaluarea unei singure margini. În cazul unor tumori mai mari cu margini echivoce dermatoscopic, acest proces trebuie însă repetat la fiecare 6-8 mm de-a lungul perimetrului, restricție datorată câmpului vizual al mozaicurilor confocale [57]. O limitare tehnică importantă este posibilitatea vizualizării prin MCR doar a straturilor cutanate superioare (până la 200-250 μm). Așadar, nu recomandăm evaluarea marginilor laterale de excizie prin această metodă în cazul CBC morfeiform/infiltrativ și micronodular, deoarece, invazia laterală a acestor subtipuri histopatologice se află frecvent în profunzime, dincolo de limita de detecție a MCR, generând astfel rezultate fals-negative. Această recomandare este susținută atât de marginea fals-negativă la examinarea MCR în cazul unui CBC micronodular în studiul nostru cât și de observațiile studiilor anterioare [57].

9. Concluzii și contribuții proprii

9.1. Concluzii

Rezultatele studiului epidemiologic realizat completează tabloul clinico-patologic și evolutiv al carcinomului bazocelular în arealul geografic al Municipiului București, în perioada Aprilie 2014 - Aprilie 2019. Lotul de pacienți studiat este reprezentativ pentru populația locală, întrucât parametrii demografici și relațiile dintre aceștia corespund datelor din raportul Institutului Național de Statistică privind Recensământul Populației și al Locuințelor din anul 2011 [61]. Datele colectate în mod retrospectiv au fost suficiente pentru îndeplinirea obiectivelor studiului.

Prima problemă rămasă nerezolvată se referă la posibilitatea etiologiilor diferite ale subtipurilor histopatologice ale CBC. Datele studiului nostru, coroborate cu cele din literatură, arată predominanța subtipului superficial la nivelul trunchiului, o zonă expusă intermitent la radiații ultraviolete în timp ce subtipul nodular a predominat la nivelul zonelor expuse cronic la soare (față, cap și gât, urechi și scalp la bărbați). Prin urmare, considerăm că sunt necesare studii suplimentare care să investigheze aceste potențiale diferențe etio-patogenice. Sunt de asemenea necesare studii adresate izolării cauzei incidențelor relativ reduse a CBC la nivelul unor zone intens expuse la soare cum ar fi membrele superioare și inferioare. O limitare o reprezintă lipsa datelor privind cuantificarea impactului bolii asupra pacienților, adresată în cadrul acestui studiu prin consultarea registrului IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation). Acest aspect este important atât la nivel local cât și național, calitatea vieții populației fiind unul din principalii indicatorii naționali. Considerăm oportună includerea CBC în registrul electronic național de cancer de piele, în prezent fiind inclus doar melanomul cutanat. Acest demers este necesar datorită lipsei datelor reale, utile pentru monitorizarea tendințelor epidemiologice și alocarea resurselor în sistemul sanitar.

Cel de-al doilea studiu prezentat demonstrează, aderând la standardele de raportare a studiilor de acuratețe diagnostică (STARD), o acuratețe globală înaltă (95,16%) a microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* pentru detectarea prezenței CBC. Studiul identifică diferențe semnificative între pattern-urile confocale ale subtipurilor histopatologice ale CBC, confirmând valoarea informațiilor morfologice suplimentare și demonstrând utilitatea MCR în diagnosticul și clasificarea preoperatorie de subtip a CBC. Gradele de acord inter- și intra-observator moderat-bune atât în cazul evaluării criteriilor dermatoscopice și confocale relevante cât și în cazul determinării prezenței CBC prin cele două mijloace imagistice neinvazive, demonstrează repetabilitatea și reproductibilitatea acestora. Avantajele abordării neinvazive complementare sunt diagnosticul rapid *in vivo* la rezoluții cvasi-histologice, corelația excelentă a imaginilor MCR cu cele dermatoscopice, necesarul scăzut de personal medical pentru examinarea MCR, gradul ridicat de acceptabilitate din partea pacienților, lipsa efectelor adverse ale investigațiilor, posibilitatea evaluării întregii leziuni (utilă în tumorile mixte), a observării fenomenelor dinamice (ex. fluxul sangvin) și urmării evoluției în cazul tratamentelor neinvazive ale CBC și reducerea costurilor materiale necesare îngrijirilor medicale asociate cu procedurile diagnostice invazive. Dezavantajele MCR sunt profunzimea limitată de examinare (200-250 μm în cazul MCR), tumorile profunde neputând fi examinate prin această tehnică,

câmpul vizual relativ redus al microscopului confocal (8×8 mm), necesitatea unei pregătiri specifice pentru interpretarea corectă a imaginilor confocale, gradul ridicat de subiectivitate în interpretarea unor structuri vizibile la MCR, imposibilitatea examinării leziunilor complet ulcerate sau localizate în regiuni anatomice inaccesibile sondelor confocale și nu în ultimul rând prețul ridicat al microscopului confocal de reflectanță. Deși studiul a inclus un număr suficient de pacienți pentru îndeplinirea obiectivelor acestuia, rezultatele obținute trebuie confirmate prin studii prospective care să determine cu o mai mare precizie sensibilitatea, specificitatea și valoarea de predictor a acestor criterii de diagnostic confocal. O provocare majoră o reprezintă profunzimea limitată de investigare prin MCR, aflată în prezent în curs de soluționare în cadrul mai multor studii aflate în desfășurare [62]. Sunt de asemenea necesare mai multe studii comparative între MCR și biopsia punch atât referitor la precizia stabilirii subtipului histopatologic de CBC cât și la costurile financiare asociate și impactul asupra calității vieții pacienților. Considerăm necesară evaluarea acurateței de identificare a subtipului histopatologic al CBC prin examinare MCR utilizând sonde confocale portabile, acestea prezentând avantajele unui timp mai scurt de examinare și a unor costuri mai reduse ale dispozitivului și consumabilelor. Studiile au arătat deja importanța biomarkerilor tumorali și a factorilor genetici și neuro-endocrini în caracterizarea comportamentului biologic al CBC [63, 64]. Tehnicile moderne de biologie moleculară pot deja standardiza pragul între malign și benign prin informațiile submicroscopice oferite, completând astfel analiza morfologică a leziunilor cutanate. Principala perspectivă de viitor o reprezintă utilizarea MCR pentru ghidarea micro-biopsiilor tumorale [65] în scopul analizei moleculare țintite. Mostra de țesut obținută printr-o astfel de microbiopsie, compusă din aprox. 2000 de celule, este imediat plasată în medii de extracție pentru ADN, ARN sau proteine. Materialul purificat poate fi examinat, prin tehnici de biologie moleculară, pentru identificarea genelor sau proteinelor cunoscute a fi markeri specifici ai afecțiunii [66].

Al treilea studiu, desfășurat prospectiv pe un număr de 10 pacienți, adaptează o metodologie deja existentă și utilizând examenul histopatologic ca standard de referință evaluează 15 margini laterale pentru un număr de 10 CBC. Includerea în analiză a fenomenului de micșorare post-excizională a fragmentelor tegumentare reprezintă unul din punctele forte ale studiului. Studiul demonstrează fezabilitatea abordării complementare prin două metode imagistice neinvazive în determinarea preoperatorie a marginilor laterale de excizie ale CBC. Avantajul metodei prezentate este precizia superioară a identificării marginilor laterale comparativ cu evaluarea clinică și dermatoscopică, utilitatea sa fiind

demonstrată mai ales în cazul tumorilor hipopigmentate cu margini laterale slab definite. Această abordare poate permite excizia chirurgicală completă a tumorii, limitând în același timp îndepărtarea de țesut indemn și ușurând reconstrucția defectului chirurgical. Dezavantajele tehnicii sunt reprezentate de timpul necesar evaluării prin MCR (aprox. 10 min./margine), sângerarea în urma efectuării inciziilor superficiale ce poate împiedica evaluarea și predispune pacientul la infecții, profunzimea limitată de examinare a MCR și nu în ultimul rând costurile ridicate ale echipamentului. Timpul necesar investigării prin MCR a marginilor poate fi însă scurtat prin utilizarea sondelor confocale portabile, sângerarea post-incizională poate fi controlată cu agenți hemostatici și prevenția infecțiilor cu antiseptice locale, în timp ce limitarea examinării MCR la straturile cutanate superioare este în prezent în curs de soluționare în multiple studii. Prin urmare, sunt necesare studii suplimentare cu un număr mai mare de pacienți pentru a evalua eficiența acestei proceduri cu scopul de a o integra procedurilor chirurgicale (ex. chirurgie micrografică Mohs) [57], atât în cazul CBC cât și în cazul altor cancere cutanate precum lentigo maligna sau carcinomul spinocelular. În aceste studii poate fi luată în considerare utilizarea sondelor confocale portabile cu scopul de a reduce timpul alocat examinării MCR. Sunt de asemenea necesare studii comparative între MCR și tehnica Mohs privind eficiențele acestora în obținerea unei prime margini histologic-negative și respectiv ratele de recidivă tumorală consecutive.

9.2. Contribuții proprii

- 1.** Analiza în dinamică a datelor confirmă creșterea prevalenței CBC, indiferent de sex, mai ales după vârsta de 60 ani. Independent de sexul pacienților, rezultatele dezvăluie o relație directă între înaintarea în vârstă și prezența tumorilor multiple (cap. 6, p. 3).
- 2.** Regiunile anatomice cele mai afectate de CBC sunt fața (în special nasul), urmată de torace, cap și gât, membre superioare și inferioare și abdomen. Se observă o scădere în timp a frecvenței tumorilor din zona feței împreună cu o creștere a acestora la nivelul toracelui, în special la pacienții mai tineri (cap. 6, p. 4).
- 3.** CBCs sunt întâlnite la pacienți semnificativ mai tineri (cap. 6, p. 4).
- 4.** Există o relație cvasi-liniară între media diametrului tumoral maxim și agresivitatea subtipului histopatologic, precum și diferențe semnificative între subtipuri în ceea ce

privește grosimea tumorală medie (cap. 6, p. 5). Subtipurile histopatologice agresive invadează structuri mai profunde. Invazia perineurală este constatată doar pentru subtipurile nodular și micronodular, indiferent de regiunea anatomică (cap. 6, p. 6).

5. Tumorile ce invadează structuri mai profunde au dimensiuni mai mari (cap. 6, p. 6).

6. Nu există variații semnificative ale frecvenței CBC recidivante - majoritatea subtip nodular sau infiltrativ - în funcție de sexul sau vârsta pacienților (cap. 6, p. 7).

7. 41,92% dintre tumorile evaluate se încadrează în clasa de risc înalt (cap. 6, p. 7).

8. Tipul cadrului de îngrijiri medicale nu este influențat de vârsta pacienților, numărul de tumori, subtipul histopatologic sau profunzimea invaziei tumorale (cap. 6, p. 8).

9. Vârsta înaintată, prezența tumorilor multiple, subtipul infiltrativ și diametrul tumoral maxim sunt asociate cu un număr mai mare de zile de îngrijiri medicale (cap. 6, p. 8).

10. Pacientul tipic suferind de CBC ce se adresează serviciilor medicale din Municipiul București în perioada Aprilie 2014 - Aprilie 2019 este: bărbat sau femeie din mediul urban, cu vârsta de ≈ 70 ani, cu o leziune unică cu diametrul de ≈ 1 cm la nivelul feței, deseori la nivelul nasului, de cele mai multe ori de subtip nodular și va fi tratat în regim de spitalizare de zi sau ambulatoriu.

11. Sensibilitatea și specificitatea dermatoscopiei pentru diagnosticul CBC sunt de 75% și respectiv 63,33%, indiferent de subtipul histopatologic (cap. 7, p. 12).

12. Multiple criterii dermatoscopice demonstrează valoare predictivă pentru subtipul histopatologic al CBC: semi-transluciditatea și globulii brun-negri în cazul CBCn; ariile centrale alb-roșii, punctele negre și absența ulcerăției pentru CBCs; vasele punctiforme în cazul subtipurilor agresive ale CBC (cap. 7, p. 14-15).

13. Valorile ridicate ale sensibilității (97,44%) și specificității (83,33%) microscopiei confocale de reflectanță pentru diagnosticul CBC, indiferent de subtip histopatologic (cap. 7, p. 16), sunt confirmate într-un studiu de acuratețe diagnostică aderent STARD.

14. Există diferențe semnificative între pattern-urile confocale ale subtipurilor histopatologice ale CBC: cordoanele conectate la epiderm sunt cel mai puternic predictor pentru subtipul superficial; insulele tumorale mari, fibrele de collagen peritumoral și

hipervascularizația în cazul CBCn; siluetele hiporefractile în cazul subtipurilor agresive ale CBC (cap. 7, p. 17-19).

15. Atipiile keratinocitare și inflamația sunt prezente în majoritatea CBC indiferent de subtip, în timp ce ulcerația, chisturile milia-like și structurile dendritice în interiorul insulelor tumorale sunt observate mai rar (cap. 7, p. 17).

16. Acordul interobservator este moderat pentru diagnosticul de CBC prin examinare MCR și doar satisfăcător pentru dermatoscopie (cap. 7, p. 20), în ciuda experienței MCR limitate a doi dintre cei trei evaluatori.

17. Acordul interobservator este satisfăcător-moderat pentru majoritatea criteriilor dermatoscopice, cu excepția ulcerației, în cazul căreia acordul este bun (cap. 7, p. 20).

18. Pentru cordoanele conectate la epiderm, ulcerație și hipervascularizație acordul interobservator este moderat, iar pentru insulele tumorale mari acordul este bun (cap. 7, p. 20).

19. Acordul intra-observator foarte bun privind prezența CBC la MCR și dermatoscopie atestă reproductibilitatea și repetabilitatea diagnosticului CBC prin aceste metode neinvazive (cap. 7, p. 21).

20. Este documentată micșorarea post-excizională a probelor de țesut prin reducerea distanțelor incizie-tumoră între examinarea MCR și cea histopatologică (cap. 8, p. 7).

21. Determinarea neinvazivă a marginilor laterale de excizie ale CBC ține cont de fenomenul de micșorare post-excizională a fragmentelor tegumentare (cap. 8, p. 7).

22. Acuratețea globală a microscopiei confocale de reflectanță pentru identificarea marginilor laterale de excizie ale CBC în lotul studiat este de 80% (cap. 8, p. 8).

Bibliografie

1. Holm AS, Nissen CV, Wulf HC. Basal Cell Carcinoma is as Common as the Sum of all Other Cancers: Implications for Treatment Capacity. *Acta Derm Venereol.* 96(4):505-509, 2016.
2. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 166(5):1069-1080, 2012.
3. Khoo ABS, Ali FR, Lear JT. Defining locally advanced basal cell carcinoma and integrating smoothened inhibitors into clinical practice. *Curr Opin Oncol.* 28(2):180-184, 2016.
4. Hoorens I, Vossaert K, Ongenae K, Brochez L. Is early detection of basal cell carcinoma worthwhile? Systematic review based on the WHO criteria for screening. *Br J Dermatol.* 174(6):1258-1265, 2016.
5. Wysong A, Aasi SZ, Tang JY. Update on Metastatic Basal Cell Carcinoma: A Summary of Published Cases From 1981 Through 2011. *JAMA Dermatol.* 149(5):615-616, 2013.
6. Kadouch DJ, Elshot YS, Zupan-Kajcovski B, van Haersma de With ASE, van der Wal AC, Leeflang M, et al. One-stop-shop with confocal microscopy imaging vs. standard care for surgical treatment of basal cell carcinoma: an open-label, noninferiority, randomized controlled multicentre trial. *Br J Dermatol.* 177(3):735-741, 2017.
7. **Lupu M**, Popa IM, Voiculescu VM, Boda D, Caruntu C, Zurac S, et al. A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *Journal of Clinical Medicine.* 8(4):449, 2019.
8. Trakatelli M, Morton C, Nagore E, Ulrich C, Del Marmol V, Peris K, et al. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol.* 24(3):312-329, 2014.
9. Kadouch DJ, van Haersma de With A, Limpens J, van der Wal AC, Wolkerstorfer A, Bekkenk MW, et al. Is a punch biopsy reliable in subtyping basal cell carcinoma? A systematic review. *Br J Dermatol.* 175(2):401-403, 2016.
10. Mun J-H, Jwa S-W, Song M, Ko H-C, Kim B-S, Kim M-B, et al. Pitfalls of Using Dermoscopy in Defining Surgical Margins of Basal Cell Carcinoma. *Dermatol Surg.* 37(11):1704-1705, 2011.
11. Nedved D, Tonkovic-Capin V, Hunt E, Zaidi N, Kucenic MJ, Graves JJ, et al. Diagnostic concordance rates in the subtyping of basal cell carcinoma by different dermatopathologists. *J Cutan Pathol.* 41(1):9-13, 2014.
12. Marghoob AA, Braun R, Kopf AW. *An Atlas of Dermoscopy.* CRC Press; 2004.
13. Reiter O, Mimouni I, Gdalevich M, Marghoob A, Levi A, Hodak E, et al. The Diagnostic Accuracy of Dermoscopy for Basal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Dermatol.* 18:S0190-9622, 2018.
14. Dinnes J, Bamber J, Chuchu N, Bayliss SE, Takwoingi Y, Davenport C, et al. High-frequency ultrasound for diagnosing skin cancer in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018.
15. Reddy N, Nguyen BT. The utility of optical coherence tomography for diagnosis of basal cell carcinoma: a quantitative review. *Br J Dermatol.* 180(3):475-483, 2019.
16. Minsky M, inventor Microscopy Apparatus. US Patent #3013467, 1961.
17. **Lupu M**, Caruntu C, Solomon I, Popa A, Lisievici C, Draghici C, et al. The use of in vivo reflectance confocal microscopy and dermoscopy in the preoperative determination

- of basal cell carcinoma histopathological subtypes. *DermatoVenerol (Buc)*. 62(4):7-13, 2017.
18. **Lupu M**, Caruntu A, Caruntu C, Boda D, Moraru L, Voiculescu V, et al. Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Molecular and Clinical Oncology*. 8(5):640-646, 2018.
 19. **Lupu M**, Vajaitu C, Papagheorghe L, Voiculescu VM, Giurcaneanu C. New diagnostic methods of the main non-melanoma skin cancers. *Medicr*. 121(1):53-61, 2018.
 20. **Lupu M**, Căruntu A, Moraru L, Voiculescu VM, Boda D, Tănase C, et al. Non-invasive imaging techniques for early diagnosis of radiation-induced squamous cell carcinoma of the lip. *Rom J Morphol Embryol*. 59:3, 2018.
 21. Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, Bruns DE, Gatsonis CA, Hooft L, et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open*. 6(11):e012799, 2016.
 22. Bichakjian CK, Aasi SZ, Alam M. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Basal Skin Cancer: National Comprehensive Cancer Network; 2018 [11.03.2019]. V 1.2019:[Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf.
 23. Ciążyńska M, Narbutt J, Woźniacka A, Lesiak A. Trends in basal cell carcinoma incidence rates: a 16-year retrospective study of a population in central Poland. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. 35(1):47, 2018.
 24. Lesiak A, Slowik-Rylska M, Rogowski-Tylman M, Sysa-Jedrzejowska A, Norval M, Narbutt J. Risk factors in Central Poland for the development of superficial and nodular basal cell carcinomas. *Archives of medical science: AMS*. 6(2):270, 2010.
 25. Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN, Bruijn JA, Westendorp RGJ. Differences in Age, Site Distribution, and Sex Between Nodular and Superficial Basal Cell Carcinomas Indicate Different Types of Tumors. *J Invest Dermatol*. 110(6):880-884, 1998.
 26. Asgari MM, Moffet HH, Ray GT, Quesenberry CP. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998-2012. *JAMA Dermatol*. 151(9):976-981, 2015.
 27. Flohil SC, Seubring I, van Rossum MM, Coebergh J-WW, de Vries E, Nijsten T. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence Rates: A 37-Year Dutch Observational Study. *J Invest Dermatol*. 133(4):913-918, 2013.
 28. Raasch B, Buettner P, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol*. 155(2):401-407, 2006.
 29. Richmond-Sinclair NM, Pandeya N, Williams GM, Neale RE, van der Pols JC, Green AC. Clinical signs of photodamage are associated with basal cell carcinoma multiplicity and site: a 16-year longitudinal study. *Int J Cancer*. 127(11):2622-2629, 2010.
 30. Flohil S, Koljenović S, De Haas E, Overbeek L, De Vries E, Nijsten T. Cumulative risks and rates of subsequent basal cell carcinomas in the Netherlands. *Br J Dermatol*. 165(4):874-881, 2011.
 31. Deja M, Teresiak E, Buczyńska-Górna M, Karas A, Jenerowicz D. Analysis of the appearance of different histological types of basal cell carcinoma, localization of the lesions, the age and sex of patients. *Postępy Dermatologii i Alergologii*. 21(5):231, 2004.
 32. Ferreira FR, Pevide Bda C, Rodrigues RF, Nascimento LF, Lira ML. Differences in age and topographic distribution of the different histological subtypes of basal cell carcinoma, Taubate (SP), Brazil. *An Bras Dermatol*. 88(5):726-730, 2013.
 33. McCormack CJ, Kelly JW, Dorewitch AP. Differences in Age and Body Site Distribution of the Histological Subtypes of Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol*. 133(5):593-596, 1997.

34. Arits AH, Schlangen MH, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Trends in the incidence of basal cell carcinoma by histopathological subtype. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 25(5):565-569, 2011.
35. Kricker A, Armstrong B, Hansen V, Watson A, Singh-Khaira G, Lecathelinais C, et al. Basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma growth rates and determinants of size in community patients. *J Am Acad Dermatol*. 70(3):456-464, 2014.
36. Takenouchi T, Nomoto S, Ito M. Factors Influencing the Linear Depth of Invasion of Primary Basal Cell Carcinoma. *Dermatol Surg*. 27(4):393-396, 2001.
37. Welsch MJ, Troiani BM, Hale L, DelTondo J, Helm KF, Clarke LE. Basal cell carcinoma characteristics as predictors of depth of invasion. *J Am Acad Dermatol*. 67(1):47-53, 2012.
38. Dixon AY, Lee SH, McGregor DH. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinoma. *The American Journal of dermatopathology*. 11(3):222-232, 1989.
39. Ministerul Sanatatii Romania. Ghid de diagnostic si tratament pentru carcinomul bazocelular 2010 [07.03.2019]. Available from: http://old.ms.ro/documente/1218%20Anexa%205_8724_6606.doc.
40. Buderer NMF. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Acad Emerg Med*. 3(9):895-900, 1996.
41. Rippey JJ. Why classify basal cell carcinomas? *Histopathology*. 32(5):393-398, 1998.
42. Longo C, Lallas A, Kyrgidis A, Rabinovitz H, Moscarella E, Ciardo S, et al. Classifying distinct basal cell carcinoma subtype by means of dermatoscopy and reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 71(4):716-724.e711, 2014.
43. Solomon I, **Lupu M**, Draghici CC, Voiculescu VM, Giurcaneanu C. Dermatoscopic pattern variability in basal cell carcinoma—implications in diagnosis, preoperative assessment, and tumor management. *RoJCED*. 5(1):36-42, 2018.
44. Grunau G, Linn S. Detection and Diagnostic Overall Accuracy Measures of Medical Tests. *Rambam Maimonides medical journal*. 9(4):e0027, 2018.
45. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
46. Que SKT, Grant-Kels JM, Longo C, Pellacani G. Basics of Confocal Microscopy and the Complexity of Diagnosing Skin Tumors. *Dermatol Clin*. 34(4):367-375, 2016.
47. **Lupu M**, Câruntu C, Vâjăitu C, Solomon I, Voiculescu VM, Popa MI, et al. In vivo reflectance confocal microscopy of spoke-wheel structures in a pigmented basal cell carcinoma. Case report. *DermatoVenerol (Bucharest)*. 64(1):11-16, 2019.
48. Nori S, Rius-Díaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P, Torres A, et al. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: A multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 51(6):923-930, 2004.
49. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J. Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol*. 143(7):883-886, 2007.
50. Braga JCT, Scope A, Klaz I, Mecca P, González S, Rabinovitz H, et al. The significance of reflectance confocal microscopy in the assessment of solitary pink skin lesions. *J Am Acad Dermatol*. 61(2):230-241, 2009.
51. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 61(2):216-229, 2009.

52. Ulrich M, Roewert-Huber J, Gonzalez S, Rius-Diaz F, Stockfleth E, Kanitakis J. Peritumoral clefting in basal cell carcinoma: correlation of in vivo reflectance confocal microscopy and routine histology. *J Cutan Pathol*. 38(2):190-195, 2011.
53. Casari A, Pellacani G, Seidenari S, Cesinaro AM, Beretti F, Pepe P, et al. Pigmented nodular Basal cell carcinomas in differential diagnosis with nodular melanomas: confocal microscopy as a reliable tool for in vivo histologic diagnosis. *J Skin Cancer*. 2011:406859, 2011.
54. Peppelman M, Wolberink EAW, Blokx WAM, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ, Gerritsen M-JP. In vivo Diagnosis of Basal Cell Carcinoma Subtype by Reflectance Confocal Microscopy. *Dermatology*. 227(3):255-262, 2013.
55. Kadouch DJ, Leeftang MM, Elshot YS, Longo C, Ulrich M, van der Wal AC, et al. Diagnostic accuracy of confocal microscopy imaging vs. punch biopsy for diagnosing and subtyping basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 31(10):1641-1648, 2017.
56. Gualdi G, Venturini M, Zanca A, Calzavara-Pinton P, Pellacani G. Pre-surgical basal cell carcinoma margin definition: the SMART approach. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 30(3):474-476, 2016.
57. Venturini M, Gualdi G, Zanca A, Lorenzi L, Pellacani G, Calzavara-Pinton PG. A new approach for presurgical margin assessment by reflectance confocal microscopy of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 174(2):380-385, 2016.
58. Blasdale C, Charlton FG, Weatherhead SC, Ormond P, Lawrence CM. Effect of tissue shrinkage on histological tumour-free margin after excision of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 162(3):607-610, 2010.
59. Dauendorffer JN, Bastuji-Garin S, Guero S, Brousse N, Fraitag S. Shrinkage of skin excision specimens: formalin fixation is not the culprit. *Br J Dermatol*. 160(4):810-814, 2009.
60. **Lupu M**, Caruntu C, Popa MI, Voiculescu VM, Zurac S, Boda D. Vascular patterns in basal cell carcinoma: Dermoscopic, confocal and histopathological perspectives (Review). *Oncol Lett*. 2019.
61. Recensământul populației și al locuințelor. București: Institutul Național de Statistică, 2011.
62. Iftimia N, Peterson G, Chang EW, Maguluri G, Fox W, Rajadhyaksha M. Combined reflectance confocal microscopy-optical coherence tomography for delineation of basal cell carcinoma margins: an ex vivo study. *J Biomed Opt*. 21(1):16006, 2016.
63. **Lupu M**, Caruntu C, Ghita MA, Voiculescu V, Voiculescu S, Rosca AE, et al. Gene Expression and Proteome Analysis as Sources of Biomarkers in Basal Cell Carcinoma. *Dis Markers*. 2016:1-9, 2016.
64. **Lupu M**, Caruntu A, Caruntu C, Papagheorghe LML, Ilie MA, Voiculescu V, et al. Neuroendocrine factors: The missing link in non-melanoma skin cancer. *Oncol Rep*. 38(3):1327-1340, 2017.
65. Lin LL, Prow TW, Raphael AP, Harrold Iii RL, Primiero CA, Ansaldo AB, et al. Microbiopsy engineered for minimally invasive and suture-free sub-millimetre skin sampling. *F1000Research*. 2:120-120, 2013.
66. Ardigò M, Agozzino M, Lynlee L, Prow TW. *Reflectance confocal microscopy-guided microbiopsies for targeted molecular analysis*. In: *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors*. CRC Press: Boca Raton, FL; 2017. p. 53-56.

Lista lucrărilor științifice publicate

I. Articole în reviste de specialitate

1. **Lupu M**, Popa IM, Voiculescu VM, Boda D, Caruntu C, Zurac S, et al. A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *Journal of Clinical Medicine*. 8(4):449, 2019. Factor de impact 5,583. <https://doi.org/10.3390/jcm8040449>
2. **Lupu M**, Caruntu C, Popa MI, Voiculescu VM, Zurac S, Boda D. Vascular patterns in basal cell carcinoma: Dermoscopic, confocal and histopathological perspectives (Review). *Oncol Lett*. 2019. Factor de impact 1,664. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10070>
3. **Lupu M**, Căruntu C, Vâjăitu C, Solomon I, Voiculescu VM, Popa MI, et al. In vivo reflectance confocal microscopy of spoke-wheel structures in a pigmented basal cell carcinoma. Case report. *DermatoVenerol (Bucharest)*. 64(1):11-16, 2019. https://revistasrd.ro/includes/files/articles/in_vivo_reflectance_confocal_microscopy_of_spoke_wheel_structures_in_a_pigmented_basal_cell_carcinoma_case_report_en_359.pdf
4. **Lupu M**, Vajaitu C, Papagheorghe L, Voiculescu VM, Giurcaneanu C. New diagnostic methods of the main non-melanoma skin cancers. *Medic.ro*. 121(1):53-61, 2018. doi: 10.26416/MED.121.1.2018.1532. <https://www.medichub.ro/reviste/medic-ro/noi-metode-diagnostice-ale-principalelor-cancere-cutanate-non-melanocitare-in-practica-medicala-id-1532-cmsid-51>
5. **Lupu M**, Căruntu A, Moraru L, Voiculescu VM, Boda D, Tănase C, et al. Non-invasive imaging techniques for early diagnosis of radiation-induced squamous cell carcinoma of the lip. *Rom J Morphol Embryol*. 59:3, 2018. Factor de impact 0,912. <http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/590318949953.pdf>
6. **Lupu M**, Caruntu A, Caruntu C, Boda D, Moraru L, Voiculescu V, et al. Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Molecular and Clinical Oncology*. 8(5):640-646, 2018. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1599>
7. **Lupu M**, Caruntu C, Solomon I, Popa A, Lisievici C, Draghici C, et al. The use of in vivo reflectance confocal microscopy and dermoscopy in the preoperative determination of basal cell carcinoma histopathological subtypes. *DermatoVenerol (Buc)*. 62(4):7-13, 2017. <https://revistasrd.ro/includes/files/articles/THE%20USE%20OF%20IN%20VIVO%20REFLECTANCE%20CONFOCAL%20MICROSCOPY%20AND%20DERMOSCOPY%20IN%20THE%20PREOPERATIVE%20DETERMINATION%20OF%20BASAL%20CELL%20CARCINOMA%20ISTOPATHOLOGICAL%20SUBTYPES.pdf>
8. **Lupu M**, Caruntu A, Caruntu C, Papagheorghe LML, Ilie MA, Voiculescu V, et al. Neuroendocrine factors: The missing link in non-melanoma skin cancer. *Oncol Rep*. 38(3):1327-1340, 2017. Factor de impact 2,976. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5817>
9. **Lupu M**, Caruntu C, Ghita MA, Voiculescu V, Voiculescu S, Rosca AE, et al. Gene Expression and Proteome Analysis as Sources of Biomarkers in Basal Cell Carcinoma. *Dis Markers*. 2016:1-9, 2016. Factor de impact 2,949. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9831237> (Premiat UEFISCDI prin LISTA 5 - actualizată 25.11.2016)

II. Lucrări prezentate la manifestările științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale

1. **Lupu M**, Draghici CC, Giurcaneanu C, Voiculescu VM, Lisievici CV. *In vivo* reflectance confocal microscopy for the diagnosis of scabies. *Zilele Dermatologiei la Sibiu*; 04-06.04.2019; Sibiu, România. (comunicare orală)
2. **Lupu M**, Caruntu C, Voiculescu VM, Giurcaneanu C. Dermatoscopic difficult lesions: The impact of reflectance confocal microscopy on the clinical decision. *Al 17-lea congres național de dermatologie cu participare internațională*; 03-06.10.2018; Brașov, România. (comunicare orală)
3. **Lupu M**, Căruntu C, Vajaitu C, Solomon I, Voiculescu VM, Popa MI, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy of the dermatoscopic spoke-wheel structures. *Al 17-lea congres național de dermatologie cu participare internațională*; 03-06.10.2018; Brașov, România. (poster)
4. **Lupu M**, Căruntu C, Solomon I, Popa A, Giurcaneanu C, Lisievici C-V, et al. Utilizarea microscopiei confocale *in vivo* în determinarea preoperatorie a subtipurilor histopatologice de carcinom bazocelular. *Al 16-lea congres național de dermatologie cu participare internațională*; 2017; Brașov, România. (poster)
5. **Lupu M**, Papagheorghe LML, Căruntu C, Voiculescu VM, Boda D. De la foto-agresiune la keratoza actinică și carcinomul spinocelular invaziv cu microscopia confocală de reflectanță. *Conferința de dermatologie „Zilele Gh. Nastase”*; 2017; Iași, România. (comunicare orală)