
REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Actualități în diagnosticul și tratamentul tumorilor maligne cutanate non-melanom ale capului și gâtului

Doctorand **Tiberiu Tamaș**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Mihaela Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Rolul ultrasonografiei în cancerul de piele non-melanom al capului și gâtului	15
1.1. Date generale	15
1.2. Considerații tehnice	19
1.3. Valoarea diagnostică a ultrasonografiei în tumorile cutanate non-melanom	23
1.4 Date relevante din literatura de specialitate	25
2. Rolul microARN-urilor în diagnosticul și tratamentul cancerului de piele non-melanom	29
2.1. Date generale	29
2.2 Date relevante din literatura de specialitate	31
2.2.1. Rolul miRNA-urilor în carcinoamele bazocelulare	31
2.2.2. Rolul miRNA-urilor în carcinoamele scuamoase	33
2.2.3. Rolul miRNA-urilor în carcinoamele cu celule Merkel	35
2.3 Implicații clinice ale miRNA-urilor în cancerul de piele	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	39
1. Ipoteza de lucru/obiective	41
2. Studiul 1 - Rolul ultrasonografiei în diagnosticul și tratamentul cancerului de piele non-melanom de la nivelul capului și gâtului	43
2.1. Introducere	43
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	46
2.3. Material și metodă	46
2.4. Rezultate	50
2.5. Discuții	59
2.6. Concluzii	63
3. Studiul 2 - Rolul miRNA-221 și miRNA-34a în cancerul de piele non-melanom al regiunii capului și gâtului	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	67

3.3. Material și metodă	67
3.4. Rezultate	72
3.5. Discuții	79
3.6. Concluzii	83
4. Studiul 3 - Detectarea miRNA-urilor prin biopsie lichidă la pacienții cu NMSC	85
4.1. Introducere	85
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	86
4.3. Material și metodă	86
4.4. Rezultate	88
4.5. Discuții	92
4.6. Concluzii	93
5. Concluzii generale (sinteză)	93
6. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	97
REFERINȚE	99

CUVINTE CHEIE: Ultrasonografie, microARN, biopsie lichidă, carcinom bazocelular, carcinom scuamos, carcinom cu celule Merkel

INTRODUCERE

Cancerul de piele non-melanom reprezintă o problemă epidemiologică contemporană, numărul de cazuri fiind actualmente în creștere la nivel global. Localizarea acestor formațiuni tumorale cu preponderență la nivelul feței, capului și gâtului reprezintă o provocare în ceea ce privește tratamentul datorită posibilităților sechele estetice și funcționale. Diagnosticul cancerului de piele se bazează pe inspecție clinică, palpate, dermatoscopie urmată de biopsie incizională sau excizională dar datele pot fi insuficiente.

Această lucrare multidisciplinară și-a propus să abordeze subiecte de actualitate care să stea la baza îmbunătățirii metodelor de diagnostic și tratament a cancerului de piele non-melanom din sfera capului și gâtului.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Diagnosticul cancerului de piele se bazează pe inspecție clinică, palpare, dermatoscopie urmată de biopsie incizională sau excizională dar datele pot fi insuficiente.

Dermatoscopia poate să aprecieze extensia leziunii în suprafață dar nu poate să determine profunzimea acesteia și potențiala invazie a structurilor adiacente. Examinările imagistice ar putea fi un element cheie în procesul de diagnostic. Computerul tomograf și imagistica prin rezonanță magnetică nu oferă informații decât în cazul tumorilor de mari dimensiuni, a invaziei osoase sau a metastazelor regionale și la distanță. Evaluarea leziunilor de mici dimensiuni rămâne o provocare. De aceea ne-am propus să evaluăm o tehnică imagistică minim invazivă, neiradiantă, necostisitoare și foarte ușor acceptată de către pacienți, ultrasonografia. Ultrasonografia în tonuri de gri cu transductori de înaltă frecvență împreună cu elastografia, permite evaluarea leziunilor mici și poate să evidențieze cu precizie o invazie de doar câțiva milimetri. Introducerea ultrasonografiei în protocolul standard de investigare a tumorilor cutanate poate reduce rata de excizii chirurgicale incomplete și a recidivelor. De asemenea ar reduce numărul de cazuri în care se realizează excizii prea extinse, sacrificii mari de țesut urmate de dificultăți de plastie a defectelor chirurgicale.

Un alt instrument terapeutic de mare actualitate este cel al biologiei moleculare. Înțelegerea acestor tumori maligne la nivel molecular poate fi cheia prevenției, a unui tratament non-invaziv și a stabilirii prognosticului. MicroARN-urile (miRNA) sunt molecule de ARN scurte, necodante, alcătuite din 17 până la 25 de nucleotide care pot controla expresia genelor post transcripționale. Fiind codificate în exoni și introni, ele au o importanță semnificativă nu numai în funcțiile celulare fiziologice, ci și în dezvoltarea și evoluția bolilor, inclusiv a tumorilor maligne. MiRNA-urile pot controla expresia genelor prin conectarea cu anumite regiuni ale ARN-urilor mesager țintă, care, la rândul lor pot regla transcripția. În funcție de tipul genelor, miRNA-urile pot avea o funcție oncogenă sau oncosupresoare. S-a descoperit că țesuturile tumorale, inclusiv cele din melanom, cancerul hepatic, cancerul de sân, cancerul de prostată și cancerul colo-rectal supraexprimă miRNA-221. În plus, procesul de metastazare, infiltrarea capsulară tumorală, stadiul avansat al tumorii și prognosticul slab sunt toate asociate cu niveluri ridicate ale miRNA-221. În tranziția epitelio-mezenchimală, rolul miRNA-221 este crucial. MiRNA-221 promovează, de asemenea, invazia țesuturilor și migrația celulară. Dezvoltarea și evoluția altor tumori maligne, inclusiv a cancerului de sân, a celui esofagian și a adenocarcinomului pulmonar sunt puternic corelate cu expresia redusă a miRNA-34a. În ceea ce privește mecanismul de acțiune, cercetările au demonstrat că inactivarea ireversibilă a miRNA-34a poate fi un mecanism defensiv al celulelor tumorale. Studiul s-a desfășurat pe două linii diferite, mai exact analiza probelor de țesut tumoral și sănătos adiacent, respectiv analiza probelor de sânge de la

pacienții afectați în comparație cu loturi sănătoase. În opinia noastră, biopsia lichidă va înlocui biopsia de țesut astfel că un studiu de acest gen s-a dovedit a fi foarte necesar.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea specială a acestei teze este compusă din trei studii prospective având în comun analiza tumorilor cutanate de tip non-melanom din regiunea capului și gâtului.

Scopul **primului studiu** a fost de a valida importanța ultrasonografiei în diagnosticul, stadializarea și tratamentul NMSC din regiunea capului și gâtului în vederea introducerii acestei metode imagistice în practica curentă. În acest sens au fost evaluați 31 de pacienți diagnosticați cu formațiuni tumorale cutanate înalt suspecte de malignitate ale pielii capului și gâtului. Aceștia au fost evaluați în secția de Chirurgie Cranio-Maxilo-Facială și în secția de Imagistică din Cluj-Napoca, România. După examenul clinic, toți pacienții au fost investigați cu ajutorul ultrasonografiei cu transductori de înaltă frecvență. În fiecare caz au fost utilizate trei tipuri de transductori: 13 MHz, 20 MHz și 40 MHz. Ulterior, formațiunile tumorale au fost investigate cu ajutorul examenului Doppler și al elastografiei. Au fost înregistrate lungimea, lățimea, diametrul, grosimea tumorii, prezența sau absența necrozei, starea ganglionilor limfatici regionali, prezența petelor hiperecogene, gradul de deformare și vascularizația. Toți pacienții au fost tratați prin rezecția chirurgicală a formațiunii tumorale urmată de reconstrucția defectului postexcizional (Figura 15). Imediat postexcizie, toate tumorile au fost măsurate din nou după același protocol.

În urma analizei datelor s-a ajuns la concluzia că ultrasonografia cu transductori de înaltă frecvență și elastografia pot măsura cu precizie grosimea tumorii și pot ghida excizia tumorii, evitând marginile pozitive și reducând rata de recurență. În ceea ce privește tratamentul NMSC al capului și gâtului, ultrasonografia poate să detecteze cu ușurință marginile de rezecție pozitive și a celor apropiate cu ajutorul transductorilor de 13, 20 și 40 MHz scăzând astfel rata recidivelor și îmbunătățind supraviețuirea globală. De asemenea, sacrificarea inutilă a țesuturilor sănătoase poate fi evitată cu ajutorul tehnicilor ultrasonografice îmbunătățind rezultatele estetice și funcționale.

Cel de-al **2-lea studiu** și-a propus să evalueze rolul micro-ARN-urilor în diagnosticul și tratamentul NMSC din regiunea capului și gâtului și implicația acestora în procesul de diagnosticare, în stabilirea prognosticului și îmbunătățirea mijloacelor terapeutice, în special în cazul stadiilor avansate.

Pentru acest studiu, în cadrul Clinicii de Chirurgie Cranio-Maxilo-Facială din Cluj-Napoca, România, au fost examinați 38 de pacienți cu formațiuni tumorale de tipul NMSC ale capului și gâtului. Pentru obținerea probelor, a fost prelevat atât țesut malign de la nivelul formațiunii tumorale cât și țesut adiacent, sănătos de la fiecare pacient. Probele au fost colectate și analizate.

Acest studiu a demonstrat că supraexprimarea miRNA-221 este prezentă în țesutul SCC și este asociată cu o frecvență mai mare a marginilor de rezecție pozitive. De asemenea exprimarea miRNA-34a este modificată în toate tipurile de NMSC ceea ce confirmă rolul acestuia în oncogeneză. Sunt necesare studii suplimentare pentru a investiga potențialul rol al miRNA 221 în diagnosticul diferențial între SCC și BCC și rolul acestuia în procesul de metastazare. De asemenea, investigațiile următoare ar trebui să se concentreze pe rolul miRNA-34a în diferențierea subtipurilor BCC pentru o mai bună abordare a subtipurilor agresive.

Biopsia lichidă este un subiect frecvent abordat în domeniul explorării noilor metode de diagnosticare motiv pentru care **cel de-al 3-lea studiu** a avut ca scop evaluarea probelor de sânge ale pacienților diagnosticați cu NMSC în vederea detectării prezenței miRNA-urilor cu rol oncogen, de exemplu miRNA-221 și miRNA-34a, nivelul de expresie al acestora în comparație cu cel din sângele pacienților sănătoși și dacă prezența acestor miRNA-uri poate fi corelată cu anumiți factori de prognostic negativ. În acest studiu au fost incluși 37 de pacienți diagnosticați cu NMSC și tratați în cadrul Clinicii de Chirurgie Cranio-Maxilo-Facială din Cluj-Napoca, România. De la fiecare pacient inclus în acest studiu au fost recoltate probe sanguine în 3 vacutainere, două cu dop mov EDTA și unul cu dop roșu cu Clot Activator, ulterior probele fiind analizate. Biopsia lichidă reprezintă viitorul în ceea ce privește tehnicile minim invazive de diagnostic și de stabilire a prognosticului unei patologii. În ceea ce privește NMSC, datele din literatura de specialitate sunt contradictorii ceea ce demonstrează și studiul actual. Aceste rezultate constituie posibile viitoare direcții de cercetare pe loturi mai mari de pacienți, pentru a stabili cu certitudine rolul acestor două miRNA-uri în apariția și dezvoltarea NMSC din sfera capului și gâtului. De asemenea, o viitoare linie de cercetare ar putea fi constituită de rolul acestor miRNA-uri și a altor miRNA-uri în procesul terapeutic în vederea unui tratament personalizat, minim invaziv.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Originalitatea acestei teze este dată în primul rând de abordarea în premieră țintit și singular regiunea capului și gâtului, o regiune extrem de importantă din punct de vedere estetic și funcțional și totodată regiunea cea mai expusă la factorii agresivi de mediu.

Prezentul studiu ultrasonografic este unul dintre cele mai complexe referitor la acest subiect deoarece am utilizat diferiți transductori pt analiză, respectiv 13,20 și 40Mhz, au fost analizate formațiunile tumorale pre-și postoperator și de asemenea au

fost utilizate modulele B-Mode, Doppler și elastografia pentru o analiză cât mai complexă. O altă inovație este dată de faptul că până în acest moment miRNA-221 a fost studiat doar în cazul SCC. Rezultatele obținute dovedesc necesitatea studiilor suplimentare pe eșantioane largi pentru a demonstra dacă supraexprimarea miRNA-221 este specifică numai pentru SCC sau pentru toate NMSC. Dacă se dovedește că miRNA-221 este supraexprimat doar în SCC, ar fi o investigație cheie în stabilirea diagnosticului preoperator și diferențierea SCC de restul NMSC.

De asemenea s-a observat un nivel de două ori mai crescut al miRNA-221 în cazurile în care una din marginile de rezecție a fost pozitivă. Conform cercetărilor noastre, s-a evidențiat în premieră această particularitate și potențiala contribuție a miRNA-221 în invazia locală microscopică. Deoarece implicarea tumorală a marginilor de rezecție chirurgicală reprezintă unul dintre cei mai semnificativi factori de prognostic negativ, detectarea nivelurilor crescute a miRNA-221 în probele de țesut tumoral ar trebui să ghidze extinderea limitelor macroscopice ale intervenției chirurgicale pentru a evita complicațiile ulterioare, cum ar fi recidiva locală.

Ultrasonografia cu transductori de înaltă frecvență poate să diferențieze tipurile de cancere tegumentare și este foarte ușor acceptată de către pacient deoarece este o tehnică non-iradiantă și non-invazivă. De asemenea poate stabili cu acuratețe grosimea tumorală astfel ghidând excizia tumorii, evitând marginile pozitive și reducând rata de recurență. Referitor la tratamentul NMSC, ultrasonografia poate să măsoare rapid distanța de la marginea formațiunii tumorale până la cea de excizie, scăzând astfel rata recidivelor și îmbunătățind supraviețuirea globală. Astfel se evită sacrificiul inutil de țesut sănătos și se favorizează obținerea rezultatelor estetice.

Studiul nostru a demonstrat că supraexprimarea miRNA-221 este prezentă în țesutul SCC și este asociată cu o frecvență mai mare a marginilor de rezecție pozitive. De asemenea exprimarea miRNA-34a este modificată în toate tipurile de NMSC ceea ce confirmă rolul acestuia în procesul de oncogeneză. Sunt necesare studii suplimentare pentru a investiga dacă miRNA 221 poate fi utilizat pentru a diferenția SCC de BCC și de asemenea care este rolul acestuia în procesul de metastazare. De asemenea, un număr mai mare de investigații ar trebui să stabilească rolul miRNA-34a în diferențierea subtipurilor BCC pentru o mai bună abordare a subtipurilor agresive.

Biopsia lichidă reprezintă viitorul în ceea ce privește tehnicile minim invazive de diagnostic și de stabilire a prognosticului unei patologii. În ceea ce privește NMSC, datele din literatura de specialitate sunt contradictorii ceea ce demonstrează și studiul nostru. Rămân deschise posibile viitoare direcții de cercetare în care să fie incluse loturi mai mari de pacienți, pentru a stabili cu certitudine rolul acestor două miRNA-uri în apariția și dezvoltarea NMSC din sfera capului și gâtului.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C. Non-Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines* 2018;6:6.
2. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014;810:120-140.
3. Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: Distribution, clinical subtypes, tumour stages and localization. *Br J Dermatol* 2003;149:1200-1206.
4. Calzavara-Pinton P, Ortel B, Venturini M. Non-melanoma skin cancer, sun exposure and sun protection. *G Ital Dermatol Venereol* 2015;150:369-378.
5. Barcaui EO, Carvalho AC, Valiante PM, Barcaui CB. Highfrequency ultrasound associated with dermoscopy in preoperative evaluation of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol* 2014;89:828-831.
6. Altamura D, Menzies SW, Argenziano G et al. Dermatoscopy of basal cell carcinoma: Morphologic variability of global and local features and accuracy of diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:67-75.
7. Nassiri-Kashani M, Sadr B, Fanian F, et al. Pre-operative assessment of basal cell carcinoma dimensions using high frequency ultrasonography and its correlation with histopathology. *Skin Res Technol* 2013;19:e132-e138.
8. Crișan D, Badea AF, Crișan M, Rastian I, Gheuca Solovastru L, Badea R. Integrative analysis of cutaneous skin tumours using ultrasonographic criteria. Preliminary results. *Med Ultrason* 2014;16:285-290.
9. Crisan M, Crisan D, Sannino G, Lupsor M, Badea R, Amzica F. Ultrasonographic staging of cutaneous malignant tumors: an ultrasonographic depth index. *Arch Dermatol Res* 2013;305:305-313.
10. Badea R, Crisan M, Lupsor M, Fodor L. Diagnosis and characterisation of cutaneous tumors using combined ultrasonographic procedures (conventional and high resolution ultrasonography). *Med Ultrason* 2010;12:317-322.
11. Bhatt KD, Tambe SA, Jerajani HR, Dhurat RS. Utility of high-frequency ultrasonography in the diagnosis of benign and malignant skin tumors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2017;83:162-182.
12. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G, Raisutis R, Jasiuniene E, Kazys R. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2011;25:375-382.
13. Bezugly A. High frequency ultrasound study of skin tumors in dermatological and aesthetic practice. *Med Ultrason* 2015;17:541-544.
14. Alfageme Roldan F. Elastography in dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2016;107:652-660.
15. Wortsman X. Sonography of facial cutaneous basal cell carcinoma: a first-line imaging technique. *J Ultrasound Med* 2013;32:567-572.

PHD THESIS SUMMARY

Updates in the diagnosis and treatment of non-melanoma cutaneous malignancies of the head and neck

PhD student **Tiberiu Tamaş**

PhD Advisor Prof.dr. **Mihaela Băciuţ**



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	11
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. The role of ultrasonography in non-melanoma skin cancer of the head and neck	15
1.1. General Dates	15
1.2. Technical considerations	19
1.3. Diagnostic value of ultrasonography in non-melanoma skin tumors	23
1.4 Relevant data from the literature	25
2. The role of miRNAs in the diagnosis and treatment of non-melanoma skin cancer	29
2.1. General dates	29
2.2 Relevant data from the literature	31
2.2.1. The role of miRNAs in basal cell carcinomas	31
2.2.2. Role of miRNAs in squamous cell carcinomas	33
2.2.3. The role of miRNAs in Merkel cell carcinomas	35
2.3 Clinical implications of miRNAs in skin cancer	35
PERSONAL CONTRIBUTION	39
1. Working hypothesis/objectives	41
2. Study 1 - The role of ultrasonography in the diagnosis and treatment of non-melanoma skin cancer of the head and neck	43
2.1. Introduction	43
2.2. Working hypothesis/objectives	46
2.3. Material and method	46
2.4. Results	50
2.5. Discussion	59
2.6. Conclusions	63
3. Study 2 - The role of miRNA-221 and miRNA-34a in non-melanoma skin cancer of the head and neck region	65
3.1. Introduction	65
3.2. Working hypothesis/objectives	67

3.3. Material and method	67
3.4. Results	72
3.5. Discussions	79
3.6. Conclusions	83
4. Study 3 - Detection of miRNAs by liquid biopsy in NMSC patients	85
4.1. Introduction	85
4.2. Working hypothesis/objectives	86
4.3. Material and method	86
4.4. Results	88
4.5. Discussions	92
4.6. Conclusions	93
5. General conclusions (summary)	93
6. Originality and innovative contributions of the thesis	97
REFERENCES	99

KEYWORDS: Ultrasonography, microRNA, liquid biopsy, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, Merkel cell carcinoma

INTRODUCTION

Non-melanoma skin cancer is a contemporary epidemiological problem, with the number of cases currently increasing globally. The localization of these tumors in the head and neck region represents a challenge in terms of treatment due to possible aesthetic and functional sequelae. The diagnosis of skin cancer is based on clinical inspection, palpation, dermatoscopy followed by incisional or excisional biopsy, but the data may be insufficient.

This multidisciplinary study aimed to address novel issues in order to improve the methods of diagnosis and treatment of non-melanoma skin cancer in the head and neck region.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The diagnosis of skin cancer is based on clinical inspection, palpation, dermatoscopy followed by incisional or excisional biopsy, but the data may be insufficient.

Dermatoscopy can assess the extent of the lesion on the surface but cannot determine its depth and potential invasion of adjacent structures. Imaging examinations could be a key element in the diagnostic process. Computed tomography and magnetic resonance imaging provide information only in the case of large tumors, bone invasion, or regional and distant metastases. Evaluation of small lesions remains a challenge. That is why we set out to evaluate a minimally invasive imaging technique, non-radiating, inexpensive and very easily accepted by patients, ultrasonography. Grayscale ultrasonography with high-frequency transducers in conjunction with elastography allows the evaluation of small lesions and can accurately highlight an invasion of only a few millimeters. The introduction of ultrasonography into the standard protocol for the investigation of skin tumors can reduce the rate of incomplete surgical excisions and recurrences. It would also reduce the number of cases in which too extensive excisions are performed, large tissue sacrifices followed by difficulties in plasty of surgical defects.

Another topical therapeutic tool is that of molecular biology. Understanding these malignant tumors at the molecular level may be the key to prevention, non-invasive treatment and prognosis. MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNA molecules of 17 to 25 nucleotides that can post-transcriptionally control gene expression. Being encoded in exons and introns, they are of significant importance not only in physiological cellular functions, but also in the development and evolution of diseases, including malignant tumors. MiRNAs can control gene expression by binding to specific regions of target messenger RNAs, which in turn can regulate transcription. Depending on the type of genes, miRNAs can have an oncogenic or tumor suppressor function. Tumor tissues including melanoma, liver cancer, breast cancer, prostate cancer, and colorectal cancer have been found to overexpress miRNA-221. In addition, metastasis process, tumor capsular infiltration, advanced tumor stage and poor prognosis are all associated with high levels of miRNA-221. In epithelial-mesenchymal transition, the role of miRNA-221 is crucial. MiRNA-221 also promotes tissue invasion and cell migration. The development and progression of other malignancies, including breast, esophageal, and lung adenocarcinoma, are strongly correlated with reduced miRNA-34a expression. Regarding the mechanism of action, research has shown that irreversible inactivation of miRNA-34a may be a defensive mechanism of tumor cells. The study was carried out on two different lines, namely the analysis of tumor and adjacent healthy tissue samples, respectively the analysis of blood samples from affected patients compared to healthy groups. In our opinion, liquid biopsy will replace tissue biopsy, so a study of this kind has proven to be very necessary.

PERSONAL CONTRIBUTION

The special part of this thesis is composed of three prospective studies having in common the analysis of non-melanoma skin tumors in the head and neck region.

The aim of the first study was to validate the importance of ultrasonography in the diagnosis, staging and treatment of NMSC in the head and neck region with a view to introducing this imaging modality into current practice. In this regard, 31 patients diagnosed with highly suspicious skin tumor formations of malignancy of the head and neck skin were evaluated. They were evaluated in the Cranio-Maxillo-Facial Surgery department and in the Imaging department in Cluj-Napoca, Romania. After clinical examination, all patients were investigated using ultrasonography with high-frequency transducers. In each case three types of transducers were used: 13 MHz, 20 MHz and 40 MHz. Later, the tumor formations were investigated with the help of Doppler examination and elastography. The length, width, diameter, thickness of the tumor, the presence or absence of necrosis, the state of the regional lymph nodes, the presence of hyperechoic spots, the degree of deformation and the vascularization were recorded. All patients were treated by surgical resection of the tumor formation followed by reconstruction of the postexcisional defect (Figure 15). Immediately postexcision, all tumors were measured again according to the same protocol.

Data analysis concluded that high-frequency transducer ultrasonography and elastography can accurately measure tumor thickness and guide tumor excision, avoiding positive margins and reducing the recurrence rate. Regarding the treatment of head and neck NMSC, ultrasonography can easily detect positive and close resection margins using 13, 20, and 40 MHz transducers, thus decreasing the recurrence rate and improving overall survival. Also, the unnecessary sacrifice of healthy tissues can be avoided with the help of ultrasonographic techniques, improving aesthetic and functional results.

The 2nd study aimed to evaluate the role of microRNAs in the diagnosis and treatment of NMSC in the head and neck region and their implication in the diagnostic process, in establishing the prognosis and improving the therapeutic means, especially in the case advanced stages.

For this study, at the Cranio-Maxillo-Facial Surgery Clinic in Cluj-Napoca, Romania, 38 patients with head and neck NMSC tumor formations were examined. To obtain the samples, both malignant tissue from the level of the tumor formation and adjacent, healthy tissue from each patient were taken. Samples were collected and analyzed.

This study demonstrated that miRNA-221 overexpression is present in SCC tissue and is associated with a higher frequency of positive resection margins. Also, the expression of miRNA-34a is modified in all types of NMSC, which confirms its role in oncogenesis. Further studies are needed to investigate the potential role of miRNA 221

in the differential diagnosis between SCC and BCC and its role in the metastasis process. Further investigations should also focus on the role of miRNA-34a in the differentiation of BCC subtypes for a better approach to aggressive subtypes.

Liquid biopsy is a frequently addressed topic in the field of exploring new diagnostic methods, which is why the 3rd study aimed to evaluate the blood samples of patients diagnosed with NMSC in order to detect the presence of miRNAs with an oncogenic role, example miRNA-221 and miRNA-34a, their expression level compared to that in the blood of healthy patients and whether the presence of these miRNAs can be correlated with certain negative prognostic factors. In this study, 37 patients diagnosed with NMSC and treated at the Cranio-Maxillo-Facial Surgery Clinic in Cluj-Napoca, Romania were included. From each patient included in this study, blood samples were collected in 3 vacutainers, two with a purple EDTA stopper and one with a red stopper with Clot Activator, later the samples were analyzed. Liquid biopsy represents the future in terms of minimally invasive diagnostic techniques and establishing the prognosis of a pathology. Regarding NMSC, the data from the specialized literature are contradictory, which is also demonstrated by the current study. These results constitute possible future research directions on larger groups of patients, to establish with certainty the role of these two miRNAs in the occurrence and development of NMSC in the head and neck sphere. Also, a future line of research could be the role of these miRNAs and other miRNAs in the therapeutic process with a view to personalized, minimally invasive treatment.

GENERAL CONCLUSIONS AND THE ORIGINALITY OF THE THESIS

The originality of this thesis is primarily due to the first and singular approach to the head and neck region, an extremely important region from an aesthetic and functional point of view, and also the region most exposed to aggressive environmental factors.

The present ultrasound study is one of the most complex regarding this subject because we used different transducers for analysis, respectively 13, 20 and 40Mhz, pre- and postoperative tumor formations were analyzed and also B-Mode, Doppler and elastography for a more complex analysis. Another innovation is given by the fact that up to this point miRNA-221 has only been studied in the case of SCC. The obtained results prove the need for further studies on large samples to demonstrate whether miRNA-221 overexpression is specific only to SCC or to all NMSCs. If it is proven that miRNA-221 is overexpressed only in SCC, it would be a key investigation in establishing the preoperative diagnosis and differentiating SCC from the rest of NMSC.

A two-fold higher level of miRNA-221 was also observed in cases where one of the resection margins was positive. According to our research, this peculiarity and the

potential contribution of miRNA-221 in microscopic local invasion were highlighted for the first time. Since tumor involvement of surgical resection margins is one of the most significant negative prognostic factors, the detection of elevated levels of miRNA-221 in tumor tissue samples should guide the expansion of the macroscopic margins of surgery to avoid further complications such as local recurrence.

Ultrasonography with high frequency transducers can differentiate the types of skin cancers and is very easily accepted by the patient because it is a non-irradiating and non-invasive technique. It can also accurately determine tumor thickness thus guiding tumor excision, avoiding positive margins and reducing the recurrence rate. Regarding the treatment of NMSC, ultrasonography can quickly measure the distance from the edge of the tumor formation to the one of excision, thus reducing the recurrence rate and improving overall survival. This avoids the unnecessary sacrifice of healthy tissue and favors the achievement of aesthetic results.

Our study demonstrated that miRNA-221 overexpression is present in SCC tissue and is associated with a higher frequency of positive resection margins. Also, the expression of miRNA-34a is modified in all types of NMSC, which confirms its role in the process of oncogenesis. Further studies are needed to investigate whether miRNA 221 can be used to differentiate SCC from BCC and also what is its role in the metastasis process. Also, a larger number of investigations should establish the role of miRNA-34a in the differentiation of BCC subtypes for a better approach to aggressive subtypes.

Liquid biopsy represents the future in terms of minimally invasive diagnostic techniques and establishing the prognosis of a pathology. Regarding NMSC, the data from the specialized literature are contradictory, which is also demonstrated by our study. Possible future research directions to include larger cohorts of patients remain open to definitively establish the role of these two miRNAs in the occurrence and development of head and neck NMSCs.

SELECTIVE REFERENCES

1. Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C. Non-Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines* 2018;6:6.
2. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014;810:120-140.
3. Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: Distribution, clinical subtypes, tumour stages and localization. *Br J Dermatol* 2003;149:1200-1206.
4. Calzavara-Pinton P, Ortel B, Venturini M. Non-melanoma skin cancer, sun exposure and sun protection. *G Ital Dermatol Venereol* 2015;150:369-378.
5. Barcaui EO, Carvalho AC, Valiante PM, Barcaui CB. Highfrequency ultrasound associated with dermoscopy in preoperative evaluation of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol* 2014;89:828-831.
6. Altamura D, Menzies SW, Argenziano G et al. Dermatoscopy of basal cell carcinoma: Morphologic variability of global and local features and accuracy of diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:67-75.
7. Nassiri-Kashani M, Sadr B, Fanian F, et al. Pre-operative assessment of basal cell carcinoma dimensions using high frequency ultrasonography and its correlation with histopathology. *Skin Res Technol* 2013;19:e132-e138.
8. Crişan D, Badea AF, Crişan M, Rastian I, Gheuca Solovastru L, Badea R. Integrative analysis of cutaneous skin tumours using ultrasonographic criteria. Preliminary results. *Med Ultrason* 2014;16:285-290.
9. Crisan M, Crisan D, Sannino G, Lupsor M, Badea R, Amzica F. Ultrasonographic staging of cutaneous malignant tumors: an ultrasonographic depth index. *Arch Dermatol Res* 2013;305:305-313.
10. Badea R, Crisan M, Lupsor M, Fodor L. Diagnosis and characterisation of cutaneous tumors using combined ultrasonographic procedures (conventional and high resolution ultrasonography). *Med Ultrason* 2010;12:317-322.
11. Bhatt KD, Tambe SA, Jerajani HR, Dhurat RS. Utility of high-frequency ultrasonography in the diagnosis of benign and malignant skin tumors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2017;83:162-182.
12. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G, Raisutis R, Jasiuniene E, Kazys R. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2011;25:375-382.
13. Bezugly A. High frequency ultrasound study of skin tumors in dermatological and aesthetic practice. *Med Ultrason* 2015;17:541-544.
14. Alfageme Roldan F. Elastography in dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2016;107:652-660.
15. Wortsman X. Sonography of facial cutaneous basal cell carcinoma: a first-line imaging technique. *J Ultrasound Med* 2013;32:567-572.