



Academia Română

Institutul de Biologie București

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Investigații privind alterările ultrastructurale și
moleculare ale interfeței tumoră-stromă peritumorală
în carcinomul bazocelular și carcinomul scuamocelular**

**Conducător Doctorat,
Cercetător Stiințific gradul I,
Dr. Mirancea Nicolae**

**Doctorand,
Moroșanu Ana-Maria**

BUCUREȘTI

-2019-

CUPRINS

	Pag.
Introducere.....	3
Scopul și obiectivele tezei.....	3
Structura tezei de doctorat.....	5
Material și metode.....	5
Rezultatele și discuții.....	6
A. Investigații ultrastructurale în leziunile cutanate premaligne.....	6
1. Keratoza seboreică.....	6
2. Hemangiomul cavernos.....	8
B. Investigații ultrastructurale și moleculare în carcinomul bazocelular și scuamocelular.....	10
1. Carcinomul bazocelular.....	10
a) Alterările ultrastructurale de la interfața tumoră-stromă peritumorală.....	10
b) Aspecte ultrastructurale ale stromei tumorale din imediata vecinătate a celulelor tumorale.....	13
2. Carcinomul scuamocelular.....	15
C. Telocitul - un fenotip particular de celulă interstițială componentă a stromei tumorale.....	16
1. Comunicări/joncțiuni directe celulă-celulă (homocelulare și heterocelulare).....	17
2. Comunicarea indirectă celulă-celulă mediată de microvezicule membranare.....	20
D. Investigarea alterărilor distribuției componentelor moleculare ale interfeței tumoră-stromă peritumorală prin IEM în CBC și CSC.....	20
Concluzii.....	25
Bibliografie selectivă din bibliografia generală a tezei de doctorat	29
Lucrări științifice publicate în tematica tezei de doctorat.....	33

INTRODUCERE

Pielea umană normală reprezentată de (1) un epiteliu stratificat pavimentos denumit epiderm, cu origine ectodermică, atașat la (2) derm, de origine mezenchimală și mai profund, la (3) hipoderm, este considerată al doilea organ ca marime al corpului uman. Pielea este un organ vital. Epidermul reprezintă prima linie de apărare față de posibilele răniri și se sprijină pe dermul subiacent. Între epidermul și dermul unui tegument normal există o așa numită zonă joncțională dermo-epidermică (ZJDE), la nivelul căreia apare ca o infrastructură anhistă continuă, cunoscută sub numele de membrană bazală (MB), o matrice extracelulară specializată, foarte bine organizată la nivel molecular, care separă și în același timp unește epidermul la derm. Depleția sau posibilele deficiențe funcționale ale oricărei componente ale membranei bazale pot fi letale în anumite stadii de dezvoltare embrionară sau în timpul nașterii, sau pot induce deteriorări ale funcției cutanate mai târziu în viață. Pielea poate fi implicată în boli de piele înnăscute sau dobândite. Există două categorii principale de cancer de piele: (1) melanom malign și (2) nemelanom. Carcinomul bazocelular reprezintă aproximativ 80% din totalul cancerelor non-melanomice ale pielii.

În ultimii ani, incidența cancerelor de piele a crescut foarte mult, datorită expunerii la factorii de risc din mediu și a neglijenței primelor semne, care de multe ori sunt leziuni premaligne. Cancerul este considerat o boală ireversibilă, în principal din cauza acumulării treptate a uneia sau a câtorva mutații și / sau a dereglării oncogenelor și a genelor supresoare de tumori și a anomaliilor cromozomale. Acesta se dezvoltă ca un proces progresiv în mai multe etape în care celulele implicate suferă modificări genetice consecutive și în colaborare cu celulele stromale dobândesc treptat schimbări fenotipice, astfel încât celulele transformate vor crește rapid și necontrolat. Cu toate acestea, modificările în celulele tumorale nu sunt suficiente pentru generarea unei tumori, fiind necesar un micromediu stromal adecvat.

Majoritatea cancerelor umane au o origine epitelială, reprezentând aproximativ 80%. Deși a existat un interes deosebit de a cunoaște aspectele morfologice ale celulelor tumorale *per se*, există încă alte modificări infrastructurale necunoscute atât ale micromediului tumoral, cât și ale micromediului extracelular care compun ecosistemul tumoral. Scopul acestei lucrări este de a cunoaște astfel de anomalii particulare care să însoțească dezvoltarea tumorii și comportamentul celulelor tumorale. Aici sunt prezentate unele observații originale obținute prin investigațiile electronomicroscopice ale diferitelor probe tumorale din pielea umană implicată în leziuni premaligne și în dezvoltarea carcinomului bazocelular (CBC) și a carcinomului scuamocelular (CSC).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Ultima decadă a fost marcată de o constatare a creșterii statistice a incidenței cancerelor tegumentare (atât a celor melanomice, cât și a celor nonmelanomice - inclusiv carcinomul bazocelular și scuamocelular), fapt ce a motivat dezvoltarea de noi studii care să permită ulterior înțelegerea

comportamentului acestor patologii și dezvoltarea unor noi abordări terapeutice. Multitudinea de leziuni premaligne, precum și clasificarea complexă a carcinoamelor au impus realizarea cât mai acurată a diagnosticului diferențial, aspect în care teza de față contribuie semnificativ prin tehnicile abordate. Astfel, cercetările dezvoltate au atât un aspect teoretic cât și unul practic, de diagnostic diferențial, prognostic și chiar o evaluare stadială.

Scopul al acestui studiu a fost descoperirea și înțelegerea unor noi aspecte de ultrastructură ce apar în cazurile de carcinom bazocelular și scuamocelular investigate de noi, pe baza datelor clinice furnizate.

Principalele **obiective** ale prezentei teze de doctorat au fost:

- 1) elaborarea unui studiu comparativ în ce privește eventualele anomalii ultrastructurale constatate în cazurile de leziuni benigne studiate (în tranziția spre fenotipul premalign), care să permită descifrarea modificărilor infrastructurale subtile care însoțesc transformarea malignă;
- 2) observarea modului în care modificările micromediului exercită o influență directă asupra epiteliiilor adiacente și contribuie la o mai bună înțelegere a transformării maligne, prin observarea alterărilor apărute la nivelul zonei de joncțiune dermo-epidermice în cazurile de leziuni premaligne examinate;
- 3) examinarea electronomicroscopică a probelor de piele de la pacienți diagnosticați cu carcinom bazocelular și scuamocelular, în vederea urmăririi modului în care se păstrează sau nu fenotipul specific al keratinocitelor;
- 4) urmărirea distribuției componentelor moleculare ale diferitelor infrastructuri din celulele tumorale de la interfața tumoră – stromă peritumorală;
- 5) detectarea prezenței telocitelor ca un fenotip distinct de celule interstițiale în interiorul stromei tumorale din CBC, respectiv din CSC, cu urmărirea stabilirii de joncțiuni homo- și heterocelulare și a transferului de microvezicule cu rol în semnalizarea celulară;
- 6) observarea unei posibile implicări a telocitelor în inducerea alterării comunicărilor celule-celule în stroma peritumorală și ulterior în întreaga masă tumorală;
- 7) constatarea unor eventuale aspecte ultrastructurale polimorfe ale alterării joncțiunilor celule-celule și celule-matrice extracelulară în carcinomul bazocelular, care pot pregăti celulele tumorale pentru creșterea lor invazivă;
- 8) compararea rezultatelor investigațiilor TEM și IEM în ce privește menținerea/pierderea polarității celulelor epiteliale;
- 9) observarea localizării unor molecule hemidesmozomale conectoare pentru citoschelet;
- 10) constatarea relevanței tuturor acestor modificări în ce privește stabilirea capacității invazive a celulelor tumorale din interiorul stromei peritumorale.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată *“Investigații privind alterările ultrastructurale și moleculare ale interfeței tumoră-stromă peritumorală în carcinomul bazocelular și carcinomul scuamocelular”* conține 298 pagini și este împărțită în două părți: **“Fundamentarea teoretică a cercetării”** și **“Rezultatele cercetărilor personale”**. Lucrarea este structurată în șase capitole, din care **“Fundamentarea teoretică a cercetării”** cuprinde 97 de pagini și conține generalități cu privire la histologia și ultrastructura normală a tegumentului, patologia tegumentului cu date de epidemiologie, etiologie, genetică și clasificare atât pentru leziunile non-maligne, cât și pentru carcinoamele nonmelanomice, dar și aspecte terapeutice în tumorile de piele. **“Rezultatele cercetărilor personale”** se extind pe 160 de pagini și este alcătuită din capitolele care descriu materialele și metodele utilizate, rezultatele și discuțiile pe baza acestora, concluziile obținute în urma investigațiilor realizate. Lucrarea cuprinde 158 de Figuri, din care 139 originale, la care se adaugă 9 scheme și 2 tabele. La final se adaugă bibliografia și lista lucrărilor științifice publicate din subiectul tezei de doctorat.

MATERIAL ȘI METODE

Conceperea și elaborarea acestei teze de doctorat a implicat experiența vastă a conducătorului de doctorat, dar și cea personală acumulată în cadrul cercetărilor științifice desfășurate (incluzând și consultarea literaturii științifice din domeniul biomedical ce se află într-o continuă dinamică și dezvoltare).

Materialul biologic reprezentat de fragmente de piele umană prelevate chirurgical din zonele afectate de leziuni premaligne, carcinom bazocelular, respectiv carcinom scuamocelular, au fost realizate cu margine de siguranță. Dr. Juravle Florin-Daniel, medic primar chirurgie plastică, microchirurgie reconstructivă și estetică, a realizat operațiile chirurgicale, iar furnizarea probelor a implicat acordul informat al pacienților. Datele referitoare la pacienți au fost preluate din foile de observație corespunzătoare.

Din totalul de **62** de probe biologice prelevate de la **58** de pacienți, **46** sunt din leziuni non-maligne, **14** sunt carcinoame bazocelulare, iar **2** sunt carcinoame scuamocelulare. Tehnicile și protocoalele utilizate în analiza materialului biologic au fost tehnici de histologie, microscopie electronică în transmisie și imunoelectronmicroscopie.

Protocolul de prelucrare a probelor în vederea investigațiilor la microscopul electronic în transmisie (TEM) s-a desfășurat conform celui standard (Ploaie și Petre, 1979), iar cel de imunoelectronmicroscopie a fost cel de dublă-imunomarcare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

A. INVESTIGAȚII ULTRASTRUCTURALE ÎN LEZIUNILE CUTANATE PREMALIGNE

1. KERATOZA SEBOREICĂ

Analiza electronomicroscopică a speciimenelor recoltate chirurgical de la un pacient care suferă de keratoză seboreică, a arătat că de obicei la nivelul zonei de joncțiune dermo-epidermice (ZJDE) o membrană bazală continuă separă epidermul de **dermul fibrotic** (Fig. 1) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

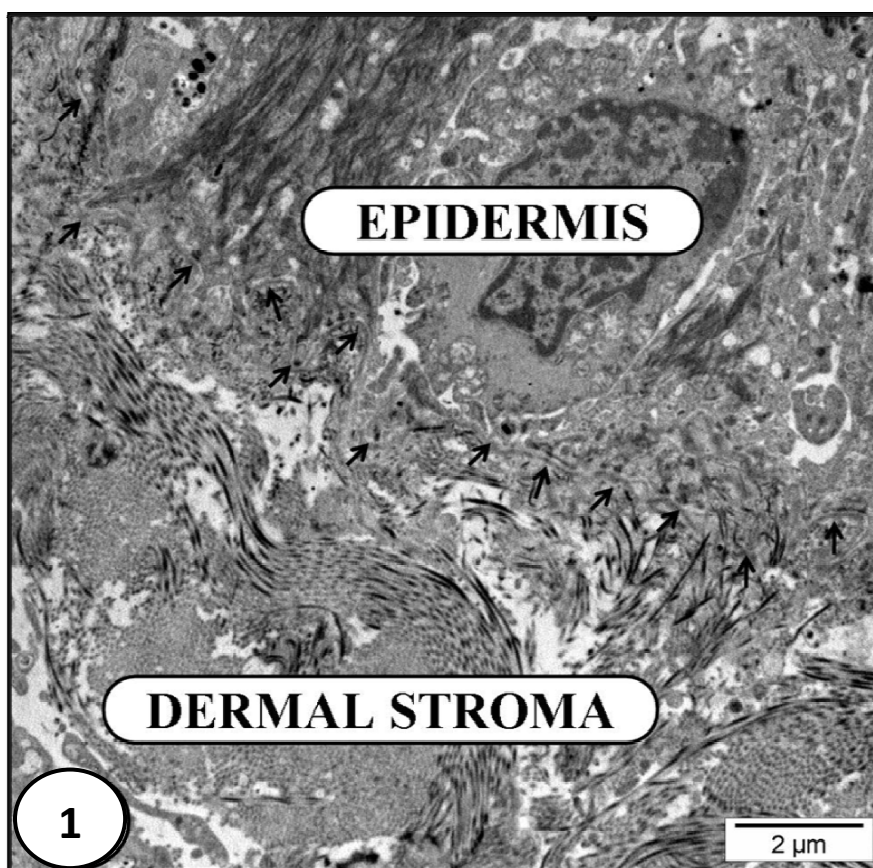


Fig. 1 - O membrană bazală continuă (săgeți) separă epidermul de dermul fibrotic. Keratoză seboreică (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Membrana bazală prezintă *lamina lucida* distinctă și continuă, dar și *lamina densa*, iar filamentele intermediare conectează joncțiunile hemidesmozomale normale. ZJDE prezintă însă și anomalii infrastructurale în unele locuri, cu porțiuni redundante ale membranei bazale (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011). Am putut constata lipsa **hemidesmozomilor** de-a lungul unor profiluri ale ZJDE, sau componente infrastructurale rezultate din destructurarea hemidesmozomilor (Fig. 2, 3). De asemenea, pot fi observate **vezicule de trafic** derivate din membranele plasmatice (caveole endocitotare, vezicule acoperite cu clatrină) (Fig. 4, 5) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

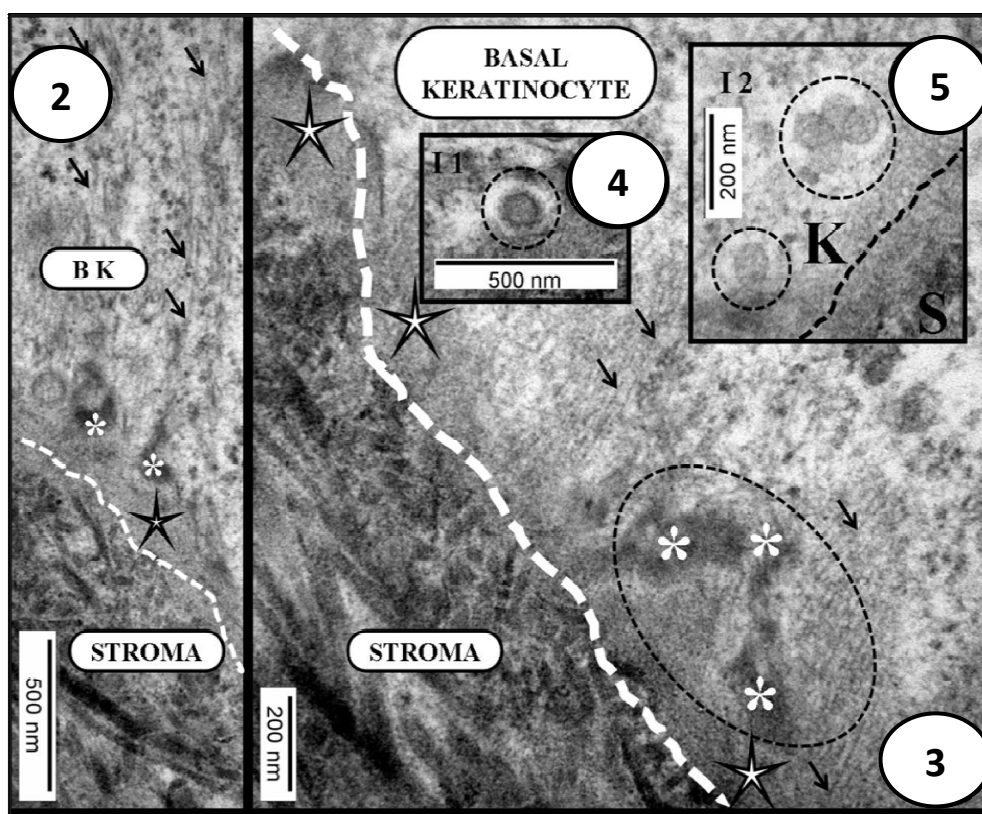


Fig. 2 - La profilul bazal al unui keratinocit bazal (BK), pot fi văzute rămășițele joncțiunilor hemidesmozomale, aici vizibile sub forma unui material dens amorf (asteriscuri), la care ajung unele filamente de keratină (săgeți). La nivelul joncțiunii dermo-epidermice (linia discontinuă întreruptă) este vizibil un material amorf depus, probabil o depozitare de membrană bazală (steluță neagră). Keratoză seboreică (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Fig. 3 - Toate anomaliile ultrastructurale descrise mai sus la **Fig. 2** sunt mai bine vizibile pe un alt profil al zonei de joncțiune dermo-epidermice. Keratoză seboreică (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Fig. 4 - O veziculă acoperită cu clatrină în interiorul keratinocitelor bazale. Keratoză seboreică (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Fig. 5 - Veziculele endocitare din apropierea membranei plasmatice a unui keratinocit bazal se îndreaptă către stromă. Keratoză seboreică (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

KS este tumoră benignă fără potențial malign (Hafner și colab., 2010), dar s-au raportat unele cazuri medicale când KS a dus la dezvoltarea carcinomului bazocelular (Akasaka și Kon, 1997) sau a melanomului malign (Zabel și colab, 2000), fără a se cunoaște dacă este doar coincidență sau dacă are loc o transformare malignă. Modificările ultrastructurale de la nivelul zonei de joncțiune dermoepidermice (ZJDE) din KS le imită pe cele descrise în carcinomul bazocelular și cel scuamocelular (Mirancea, **Șerban** și colab. 2009; Mirancea, **Moroșanu** și colab. 2010).

În urma examinării electronomicroscopice, am putut observa în cazul KS existența **telocitelor**, un fenotip special de celulă stromală, telocite pe care le-am **identificat și descris pentru prima dată în KS** (manuscris în preparare). De regulă, în KS telocitele prezintă una sau două extensii telopodiale (**Fig. 6**). Telocitele au un nucleu eucromatic, în care uneori se distinge un nucleol (**Fig. 6**). În citoplasma telocitelor, principalele organite citomembranare sunt concentrate în vecinătatea nucleului.

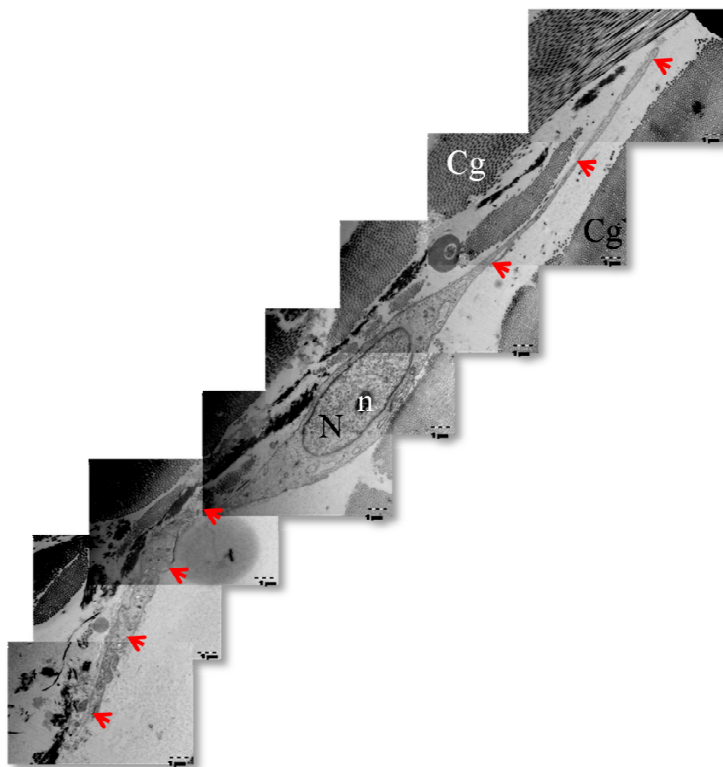


Fig. 6 – Telocit bipolar, ce prezintă două telopode (săgeți) și un nucleu eucromatic (N) nucleolat (n). Cg – collagen. Keratoză seboreică. Proba T3.

2. HEMANGIOMUL CAVERNOS

Secțiunile semifine de la pacienții cu hemangiom cavernos analizate la **microscopul optic**, au arătat o mulțime de capilare mari și neregulate ca structură, cu pereți anormal de subțiri care sunt predispuși la pierderi (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Pe **secțiunile ultrafine** examinate la **microscopul electronic** în transmisie s-a observat prezența celulelor roșii sanguine extravazate în interiorul stromei dermice, sub epidermul displazic spre anaplazic. Aproape toate keratinocitele și-au pierdut fenotipul epitelial: lipsesc joncțiunile desmozomale sau sunt precare, filamentele intermediare sunt absente, membrana bazală lipsește la interfața dermo-epidermică și nu se poate detecta joncțiunea hemidesmozomală.

Eucromatina este reprezentată prevalent în interiorul majorității nucleilor celulelor epiteliale și pot fi văzuți nucleoli uriași (**Fig. 7**). La o mărire mai mare, celulele roșii sanguine extravazate sunt în contact direct cu celule epidermice displazice până la anaplazice.

Nu este interpusă o membrană bazală. Pot fi detectate reziduuri ale unei joncțiuni hemidesmozomale reprezentate de placa externă. Niciun filament intermediar nu a atins polul bazal (**Fig. 8**). În **Fig. 9** prezintă un profil scurt la joncțiunea dermo-epidermică unde stroma fibroasă se află în contact direct cu keratinocitele bazale. Joncțiunile desmozomale sunt de asemenea afectate, iar filamentele de citokeratină se conectează rar sau deloc cu aceste joncțiuni intercelulare.

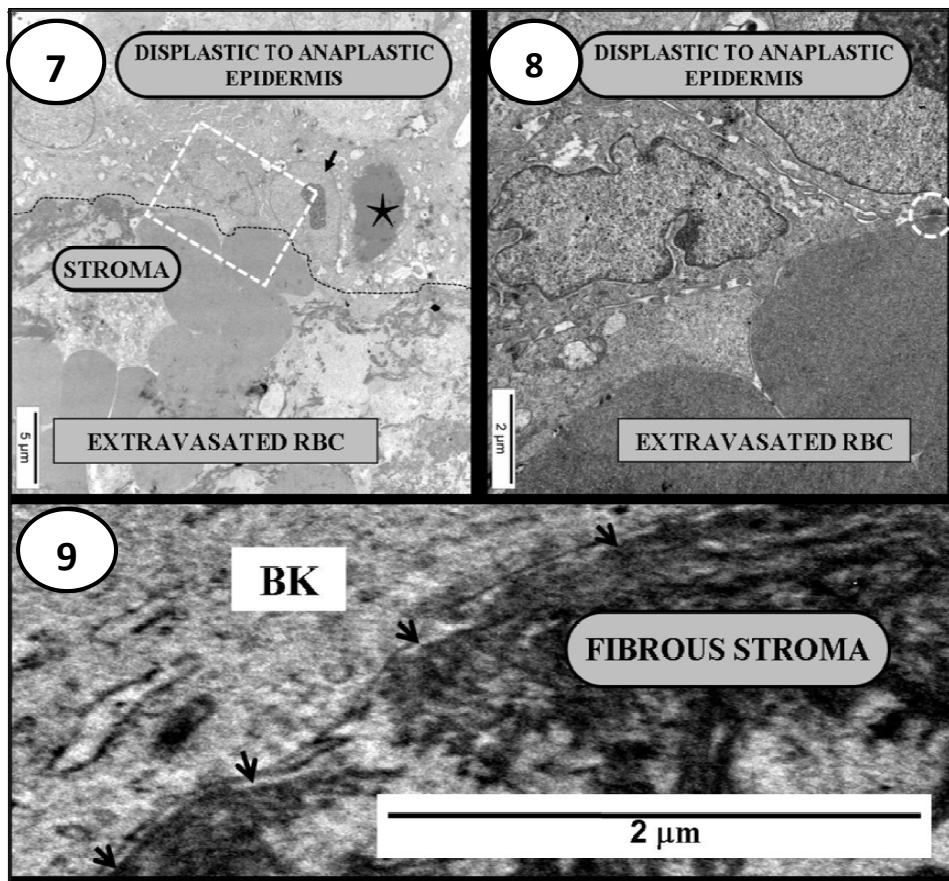


Fig. 7 - Celule roșii sanguine extravazate (RBC) în interiorul stromei dermice sub epidermul displazic până la anaplazic. Keratinocitele aproape și-au pierdut fenotipul epitelial: lipsesc joncțiunile desmozomale sau, atunci când sunt prezente, sunt precare. Filamentele intermediale sunt absente. Săgeata marchează o celulă anaplazică cu un nucleu imens și steluța marchează o celulă apoptotică. Mai mult, membrana bazală lipsește la interfața dermo-epidermică (linia neagră întreruptă) și nu poate fi detectată nicio joncțiune hemidesmozomală. Hemangiom cavernos (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Fig. 8 - Detaliu din zona încadrată în **Fig. 7**. Celulele roșii sanguine extravazate (RBC) sunt în contact direct cu celulele epidermice displazice până la anaplazice. Nu este interpusă nicio membrană bazală. Zona încercuită delimitează o rămășiță a unei joncțiuni hemidesmozomale reprezentate de placa externă. Niciun filament intermediar nu ajunge la polul bazal. Hemangiom cavernos (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Fig. 9 - Un scurt profil la nivelul joncțiunii dermo-epidermice. Stroma fibrotică vine în contact direct (săgeți) cu un keratinocit bazal (BK). Hemangiom cavernos (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011).

Unele celule epiteliale au fost angajate într-un proces apoptotic. De-a lungul contactelor intercelulare, nu pot fi detectate joncțiuni desmozomale. Uneori, poate fi detectat canalicul intracelular. Toate aceste anomalii infrastructurale oferă un suport real pentru diagnostic: epidermul apare ca un epiteliu displazic până la anaplazic. Anomaliile microvasculaturii sanguine au condus la formarea unor zone hemoragice extinse aflate în contact cu epitelul epidermic (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011). Fără bariera normală reprezentată de peretele endotelial și membrana bazală asociată și absența pericitelor, factorii paracrini vor induce un efect foarte intens și nelimitat asupra epidermului. Astfel, membrana bazală și joncțiunile hemidesmozomale sunt primele ținte pentru enzimele litice. Acțiunea agresivă a acestui tip de factori paracrini eliberați ușor de către celulele sanguine extravazate (Mueller și Fusenig, 2004) la celulele epidermice, conduce la schimbarea fenotipului epitelial: joncțiunile celule-celule și celule-matrice extracelulară sunt distruse, citoscheletul reprezentat de filamente de citokeratină a dispărut, ceea ce a condus la depolarizarea celulară.

B. INVESTIGAȚII ULTRASTRUCTURALE ȘI MOELCULARE ÎN CARCINOMUL BAZOCELULAR ȘI SCUAMOCELULAR

1. CARCINOMUL BAZOCELULAR

a) Alterările ultrastructurale de la interfața tumoră-stromă peritumorală

În această teză de doctorat am studiat modificările dinamice ale fenotipurilor carcinoamelor (carcinomul bazocelular - CBC și carcinomul scuamocelular - CSC), urmărind alterările de la interfața tumoră-stromă peritumorală, de la nivelul stromei peritumorale dar și al joncțiunilor desmozomale și hemidesmozomale. Astfel, am observat că fenotipurile celulelor tumorale din ambele tipuri de carcinom erau sever alterate, păstrând totuși unele infrastructuri care amintesc de originea lor epitelială.

În cazul perturbărilor apărute în distribuția moleculelor din componența MB și a hemidesmozomilor, are loc **depolarizarea** epiteliului, cu angajarea acestuia în proliferare malignă. Tumorile dezvoltate de epiteliul epidermic la interfața tumoră-stromă au arătat un front neregulat al creșterii, constatându-se afectarea foarte severă a stratificării celulare și în consecință are loc pierderea polarității celulelor (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2010).

În CBC, **filamentele de keratină** sunt sever afectate (nu conectează membrana plasmatică bazală a celulelor tumorale aflate la stroma tumorii), deoarece hemidesmozomii sunt defecți, sau lipsesc (**Moroșanu** și colab., 2013) (**Fig. 10, 11, 12**). În urma examinării electronmicroscopice, am observat uneori resturi ale joncțiunilor **hemidesmozomale**, iar filamentele intermediare pot fi văzute sub formă de mănunchiuri perinucleare sau rare filamente de citokeratină (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2011). Deoarece **desmozomii** sunt de asemenea sever afectați sau lipsesc, tonofilamentele au format conglomerate de filamente de keratină care au captat și internalizat desmozomi în interiorul citoplasmei. Datorită alterării joncțiunilor intercelulare, inclusiv **internalizarea desmozomilor**, spațiile intercelulare devin anormal mărite.

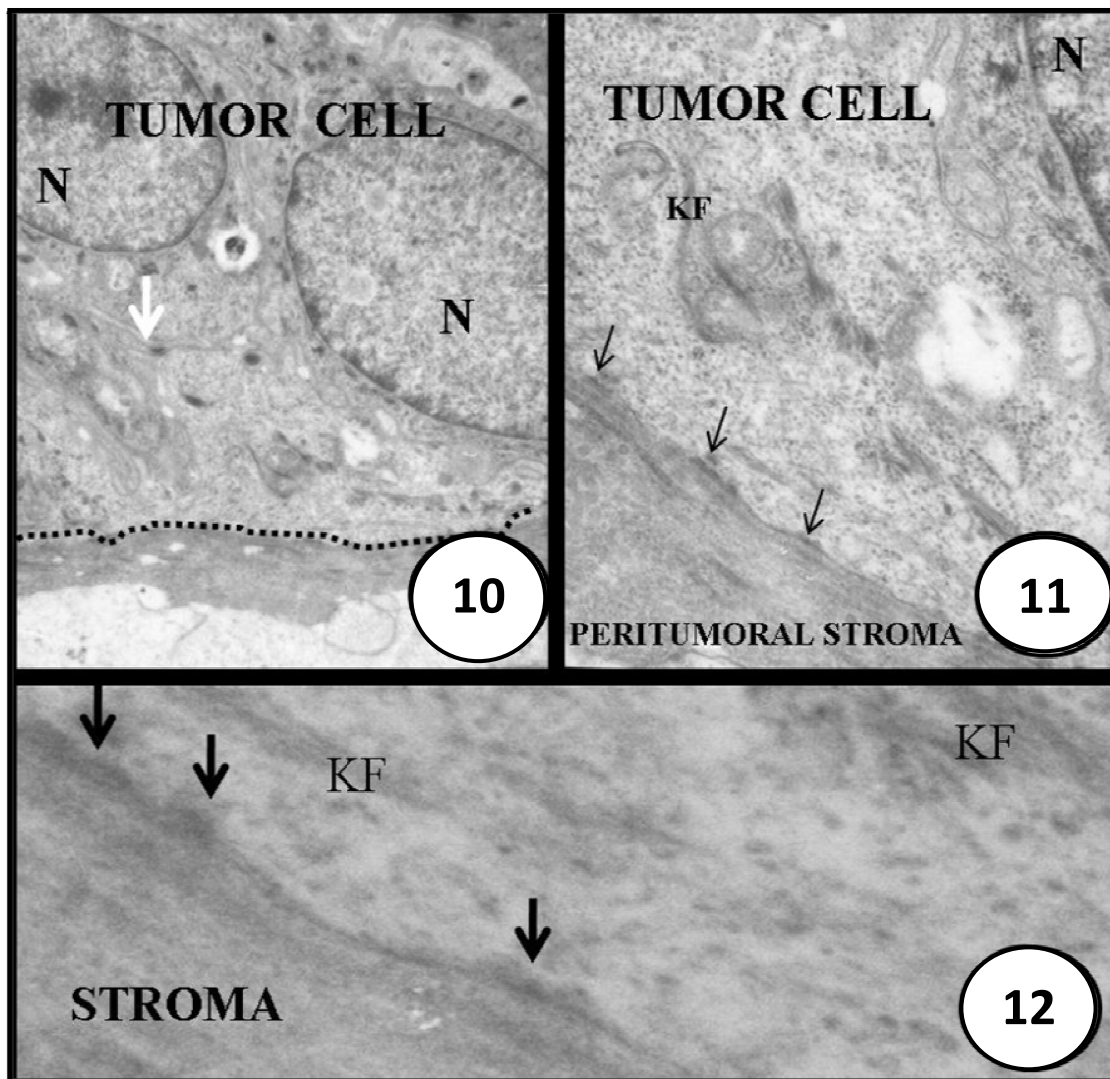


Fig. 10 - Polul bazal de la două celule tumorale cu nuclei eucromatici (N). Săgeata albă marchează o joncțiune desmozomală deficientă. Limita dintre celulele tumorale și stroma peritumorală este delimitată de puncte negre. ($\times 13.200$). CBC (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2010).

Fig. 11 - Polul bazal al unei celule tumorale. Filamentele de keratină (KF) nu ajung la hemidesmozomii defecti (săgeți). N = nucleu. ($\times 24.300$). CBC (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2010).

Fig. 12 - Detalii pentru hemidesmozomii defecti (săgeți) care nu prezintă plăci interioare și în consecință, filamentele de keratină (KF) nu reușesc să conecteze hemidesmozomii ($\times 65.000$). CBC (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2010).

Fenotipul de „*conduit system*” identificat pentru prima dată de noi în carcinomul bazocelular este unul particular întrucât, diferit de alte „*conduit systems*” raportate până acum în literatura de specialitate în alte tipuri de țesuturi ca având o membrană bazală ce separă matricea fibrilară amorfă de restul țesutului, cel descris de noi nu prezintă o membrană bazală vizibilă, izolarea matricei sale fiind realizată de celulele tumorale care încă sunt solidarizate între ele prin joncțiuni desmozomale și care formează pereții acestuia (**Fig. 13**). Aceste structuri unice par să joace un rol important pentru transportul fluidelor și a unor molecule solubile cu greutate redusă, precum chemokinele (Sixt și colab., 2005; Roozendaal și colab., 2008; Roozendaal și colab., 2009).

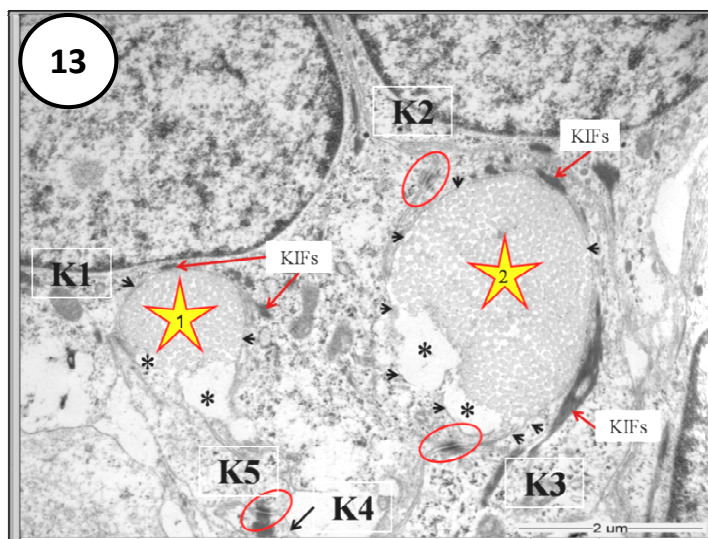


Fig. 13 - În interiorul masei tumorale, există „conduit systems” particulare (stelute mari 1 și 2) delimitate de celulele tumorale (K1-K5) care păstrează în continuare niște filamente intermediale de keratină (KIF) și jonctiuni desmozomale (zone eliptice). „Conduit systems” cu un miez reprezentat de fibrile de collagen în secțiune transversală sunt delimitate de membranele plasmatică ale celulelor tumorale (săgeți). Pot fi văzute spații goale în interiorul fiecărui „conduit system” (asteriscuri) (manuscris în preparare). CBC.

La nivelul interfeței tumoră-stromă peritumorală se observă **disoluția membranei plasmatică** a celulelor tumorale, ceea ce a contribuit la formarea microveziculelor membranare.

Procesul de **recombinare de membrane** este un tip special de comunicare intercelulară, prin intermediul căruia, la locul confruntării plasmalemelor celor două celule are loc o disoluție, ce permite o comunicare deschisă între celule (Mirancea și colab., 2013). Celulele canceroase pot fuziona cu celule normale (stromale, epiteliale, macrofage), dar și cu alte celule canceroase, rezultând hibridi ce prezintă noi proprietăți (Mohr și colab., 2015) și heterogenitate crescută (Coward și Harding, 2014).

Unele celule tumorale au prezentat **microvezicule membranare** sau numeroase infrastructuri asemănătoare lizozomilor (Fig. 14, detaliu în Fig. 15) (Mirancea, Șerban și colab., 2009).

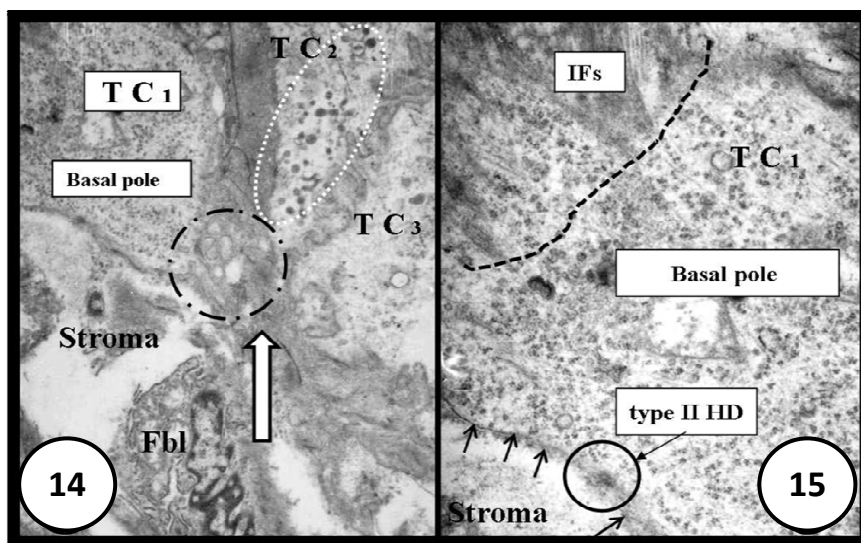


Fig. 14 - Polul bazal al câtorva celule tumorale epiteliale bazocelulare (TC1-TC3) la interfața cu stroma asociată. Zona încercuită de linii și puncte circulare negre descrie un sector modificat al polului bazal al celei tumorale TC1 prin eliminarea veziculelor. În interiorul unei alte celule tumorale (TC2) pot fi detectate numeroase infrastructuri asemănătoare lizozomilor (zona elipsoidală albă); Fbl = fibroblast; ($\times 10.500$). CBC (după Mirancea, Șerban și colab., 2009).

Fig. 15 - Zona mărită a celei tumorale TC1 din Fig. 14. Filamentele de keratină (KF) nu ajung la polul bazal din cauza lipsei plăcii interne a hemidesmozomului (zona încercuită) ($\times 10.500$). CBC (după Mirancea, Șerban și colab., 2009).

În aproape toate cazurile noastre investigate de CBC, precum și CSC (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013; Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2010), am detectat microvezicule eliberate de către celulele tumorale. Celulele canceroase eliberează sau cantități mari de microvezicule membranare care pot fi transferate și la celulele netransformate (celulele stromale precum fibroblaștii, celulele endoteliale și celulele inflamatorii infiltrate). Astfel de evenimente pot contribui la angiogeneza tumorală, precum și la migrarea tumorilor, invazivitatea și diseminarea ectopică pentru a dezvolta o tumoră secundară (metastază), rezistența la medicamente și ierarhia celulelor stem canceroase (Lee și colab., 2011).

Unele zone ale epitelului epidermic neoplazic au arătat prelungiri extinse ale celulelor care pătrund adânc în stroma peritumorală, iar membrana bazală și hemidesmozomii însoțesc aceste prelungiri (dar în unele zone lipsesc) denumite **invadopodii**. Din cauza fragilității membranei plasmatică, conținutul celular tinde să hernieze în stroma peritumorală. Uneori, polul bazal al celei tumorale este umplut cu o multitudine de vezicule asemănătoare lizozomilor și aparent goale.

b) Aspecte ultrastructurale ale stromei tumorale din imediata vecinătate a celulelor tumorale

Zona de joncțiune dermo-epidermică este grav alterată în timpul carcinogenezei epidermice, astfel încât, în concordanță cu progresia tumorii **MB** devine iluzorie sau chiar în dispare totalitate, ceea ce constituie un semn distinctiv al unei evoluții nefavorabile a CBC.

În cadrul investigațiilor ultrastructurale efectuate prin TEM, am observat că la interfața cu stroma peritumorală asociată, **membrana bazală lipsește** adesea, sau poate fi observat un material amorf atașat la membrana plasmatică de la interfața cu stroma peritumorală. Uneori, limita dintre celulele tumorale și stroma adiacentă pare liniară, dar nu poate fi detectată nicio membrană bazală, iar **joncțiunile hemidesmozomale lipsesc** în totalitate și, prin urmare, tonofilamentele nu ajung la polul bazal al membranei plasmatică (**Fig. 16**). Deoarece MB lipsește, din loc în loc, celula tumorală emite **invadopodii** care penetrează adânc în interiorul stromei peritumorale. De-a lungul zonei periferice a invadopodiului cu micromediul, inclusiv vârful acesteia, nu pot fi văzuți hemidesmozomi și nici MB (**Fig. 17**).

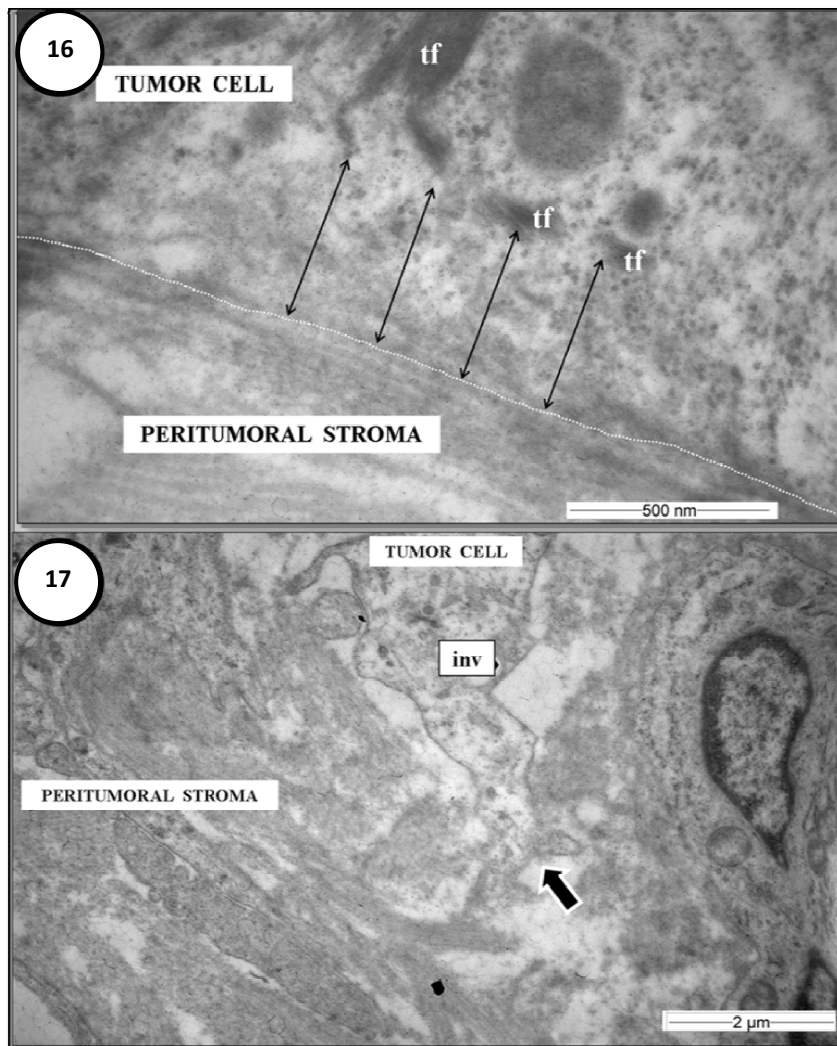


Fig. 16 - Sector mic al unei celule maligne aflate la stroma peritumorală. Linia punctată marchează interfața dintre o celulă tumorală și stroma peritumorală, unde nu poate fi detectată nicio membrană bazală. Lipsesc total joncțiunile hemidesmozomale. Tonofilamentele (tf) nu ajung la nivelul polului bazal al membranei plasmatică, astfel încât un spațiu remarcabil (săgeți cu două capete) separă citoscheletul de profilul bazal. CBC (după **Moroșanu** și colab., 2013).

Fig. 17 - Un invadopodiu (inv) tumoral penetrează profund în interiorul stromei peritumorale. De-a lungul zonei periferice a invadopodului cu micromediul, inclusiv vârful (săgeată) acestuia, nu pot fi văzuți hemidesmozomi și nici membrană bazală. CBC (după **Moroșanu** și colab., 2013).

În cazul CBC, plăcile de ancorare sunt destructurate, **fibrelor de Cg VII** fiind ectopic localizate sau chiar lipsesc în totalitate.

Stroma tumorală este infiltrată masiv cu **celule inflamatorii** care și-au eliberat conținutul lizozomal (implicat în distrugerea matricei extracelulare adiacente) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013). În unele zone, celulele sanguine extravazate se amestecă cu celule tumorale invazive. Permeabilitatea vasculară remarcată ce face ca celulele roșii și cele albe să disemineze în interiorul sau în spațiile peritumorale (Mirancea și Mirancea, 2010, a; Mirancea și colab., 2014; Constantin și colab., 2015; Stratman și Davis, 2012), astfel că celulele sanguine inflamatorii devin surse bogate de agenți proinflamatori, o condiție pentru statusul bine-cunoscut al tumorii ca o boală care nu se vindecă (Dvorak, 1986).

2. CARCINOMUL SCUAMOCELULAR

La nivelul interfeței tumoră-stromă peritumorală în cazul CSC s-a observat că în timp ce porțiuni de masă tumorală penetrează în interiorul stromei, fâșii de stromă penetrează în interiorul masei tumorale (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2009).

Joncțiunile desmozomale dintre celulele tumorale adiacente ce se află la interfața cu stroma lipsesc sau sunt precare, iar spațiile intercelulare sunt umplute cu numeroase extensii celulare fine (**Fig. 18**, cadru C). Conexiunea dintre desmozomi și tonofilamentele de keratină lipsește. Uneori, membranele plasmaticice aflate provenite de la două celule tumorale adiacente prezintă fenomenul de **recombinare de membrane** asociat cu **veziculele acoperite cu clatrină** (**Fig. 18**, cadru A) (Mirancea, **Șerban** și colab., 2009).

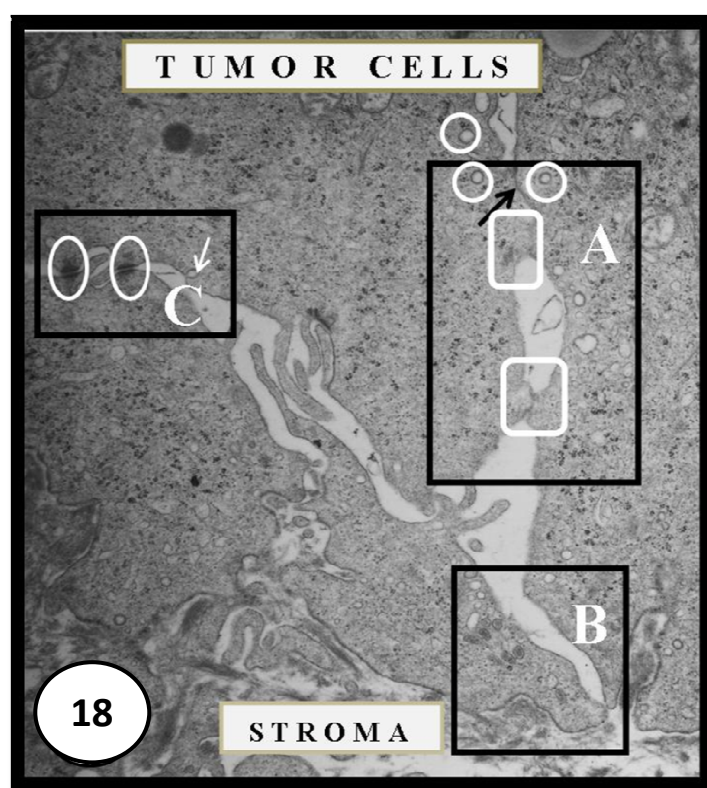


Fig. 18 - Ansamblu al polului bazal al unor celule tumorale aflate între ele sau cu stroma peritumorală. Spațiile intercelulare sunt mari. Joncțiunile desmozomale aproape lipsesc, dar unde sunt prezente (zone eliptice în C), sunt afectate, iar legătura lor cu tonofilamentele lipsește. Uneori, într-o oarecare măsură, membranele plasmaticice aflate de la două celule tumorale adiacente prezintă fenomen de recombinație de membrană (cadre albe în A). În interiorul marginii unor invadopodii există lizozomi; hemidesmozomii lipsesc (cadru B) ($\times 19,000$). CSC (după Mirancea, **Șerban** și colab., 2009).

La interfața polului bazal al celulelor tumorale cu stroma peritumorală, **membrana bazală** (MB) lipsește; foarte rar, pot fi detectate doar mici petice de material amorf bazal similar membranei bazale. În interiorul unor **invadopodii** se află lizozomi. **Joncțiunile hemidesmozomale** lipsesc și ele, iar când sunt prezente prezintă defecte la nivelul plăcilor interne, astfel încât conexiunea lor cu filamentele intermediare de keratină este desființată. Ocazional, pot fi detectați hemidesmozomi precari și localizați ectopic (în poziție bazo-laterală).

Atât celule tumorale epiteliale, cât și stroma adiacentă suportă schimbări evidente ale interfeței tumoră-stromă. Celulele tumorale au prezentat procesul de eliberare a **veziculelor** la contactul lor cu țesutul stromal. În interiorul stromei peritumorale, **microvasele** sanguine sunt foarte fragile, astfel încât, pot fi detectate celule roșii și albe din sânge în cantități mari în imediata vecinătate a masei tumorale, chiar și printre celulele tumorale.

C. TELOCITUL - un fenotip particular de celulă interstițială componentă a stromei tumorale

Având în vedere interesul deosebit pe care îl manifestă diferite laboratoare din întreaga lume științifică pentru fenotipul celular recent descoperit cunoscut sub numele de telocit, în această teză am acordat o importanță specială cunoașterii ultrastructurii telocitului și a relațiilor sale homo- și heterocelulare.

În piele, telocitele se găsesc în imediata vecinătate a fibrelor de colagen și a fibrelor elastice, precum și cu celulele mast, fibroblaștii, adipocitele, vasele de sânge, nervii și în jurul clusterului de celule stem de la nivelul bazei foliculului de păr („*bulge*”) (Rusu și colab., 2012, a; Ceafalan și colab., 2012). Telocitele se află în principal în interiorul stromei fibrotice (peri)-tumorale. Cele mai multe telocite pe care le-am observat apar ca celule bipolare având un nucleu ovoid, cu eucromatină predominantă; heterocromatina apare predominant atașată la membrana internă a anvelopei nucleare (**Fig. 19**). Corpul celular împreună cu cele două extensii celulare numite telopode are aproximativ 50 μm. Adesea, reticulul endoplasmatic rugos (REG) este situat în imediata vecinătate a nucleului, iar aparatul Golgi apare în regiunea perinucleară. Telopodele prezintă alternanța segmentelor dilatate (podomi) și a segmentelor subțiri (podomeri) (**Fig. 19 B**) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013).

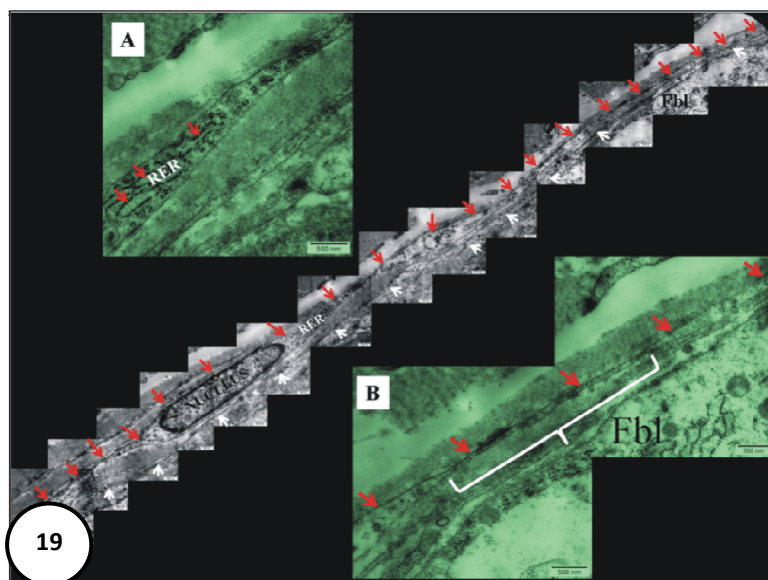


Fig. 19 - Un telocit bipolar are un nucleu ovoid cu eucromatină predominantă; heterochromatina apare predominant atașată la membrana internă a anvelopei nucleare. Corpul celular împreună cu cele două extensii celulare (telopode) (săgeți roșii) măsoară aproximativ 50 μm; un telopod este foarte lung. Un telopod extrem de lung (vârfuri de săgeți albe) aparținând unui alt telocit al cărui corp celular (inclusiv nucleul) nu este vizibil, se desfășoară în paralel cu telocitul nucleat. Reticulul endoplasmatic rugos (RER) este situat în imediata vecinătate a nucleului (**A**). În (**B**), un detaliu pentru telopodul lung (săgeți roșii) arată alternanța segmentelor dilatate (podomi) și a segmentelor subțiri (podomere) (acolada). Fbl = Fibroblast. (**A**) și (**B**) colorate digital în culoarea verde. CBC (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013).

Uneori, membranele plasmaticice ale celor două telocite conectate (o joncțiune homocelulară) devin fuzionate și realizează fenomenul de **recombinare a membranelor plasmaticice**. În studiul actual, nu am identificat telocite în contact direct cu celulele tumorale sau celulele stem canceroase putative, iar telocitele apar localizate la diferite distanțe față de celulele maligne ale tumorii (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013).

Telocitele din stroma tumorală a CBC și CSC sunt capabile să realizeze (1) **comunicări/joncțiuni directe** celulă-celulă (a) **homocelulare** (sinapse somatice/stromale) sau (b) **heterocelulare** (sinapse somatice/stromale între două sau mai multe telocite adiacente), precum și (2) **comunicări indirecte celulă-celulă** prin eliberare de **microvezicule** (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013), iar uneori un telocit poate realiza concomitent joncțiuni homocelulare cu alt telocit și joncțiuni heterocelulare cu alte tipuri de celule.

1. Comunicări/joncțiuni directe celulă-celulă **(homocelulare și heterocelulare)**

În țesuturile normale, telocitele realizează sinapse stromale între ele - **joncțiuni homocelulare** și cu alte tipuri de celule - **heterotipice** (Popescu și Faussone-Pellegrini, 2010; Gherghiceanu și Popescu, 2012; Rusu și colab., 2012, a, b). Joncțiunile intercelulare pe de o parte, și cele dintre celule și matricea extracelulară pe de alta parte, joacă un rol-cheie în creșterea celulelor, morfogeneza tisulară, menținerea polarității celulei, precum și în fiziopatologia țesuturilor, inclusiv reînnoire și reparație (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013).

❖ Joncțiuni homocelulare

Spațiul intercelular, care separă două telocite implicate într-o **joncțiune homocelulară** somatică, se află în intervalul de interacțiune macromoleculară (cca. 10-30 nm) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013). Unele telocite stabilesc sinapse stromale la capetele teleopodelor lor (**Fig. 20**).

Aspecte ultrastructurale detaliate ale sinapselor somatice realizate prin apozitia telocitelor „*end-to-end*”, au arătat că un material dens electronomicroscopic este atașat la fața internă a membranelor plasmaticice (plăci interioare) ale ambelor telocite (nu se cunoaște compoziția moleculară a unor astfel de plăci interne) (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013). Un telocit poate dezvolta concomitent joncțiuni homo- și heterocelulare.

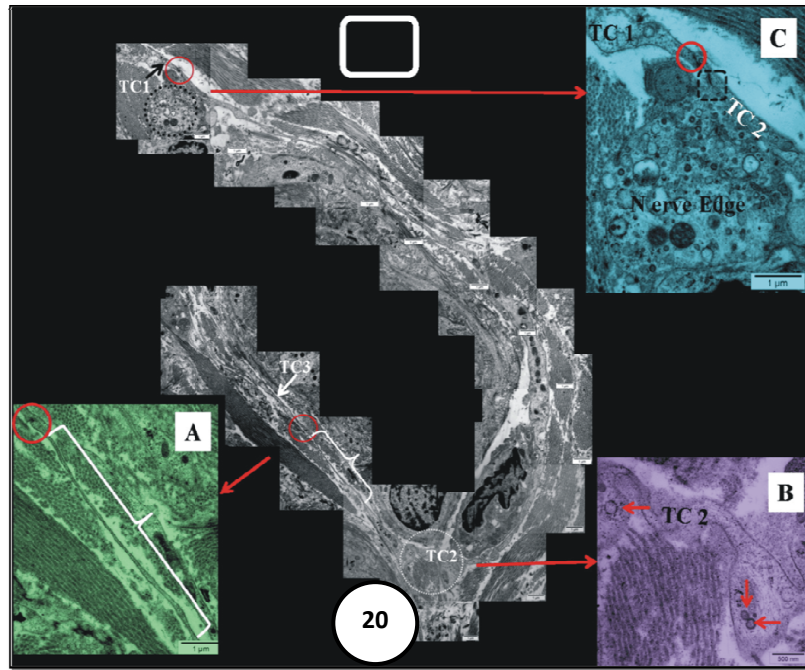


Fig. 20 - Concatenarea bidimensională (2-D) secvențiată a 18 imagini electronice în serie. În interiorul țesutului dermal peritumoral cutanat din CBC al pielii, trei telocite sunt conectate între ele prin joncțiuni homocelulare/sinapse stromale (zone cu cercuri roșii). Corpul nuclear al telocitelor nu este vizibil. Cel mai lung telopod a măsurat aprox. 55 μm. În (A) este un detaliu pentru un telopod subțire (acolada) al telocitului TC2 conectat printr-o sinapsă somatică (zonă încercuită) cu telocitul TC3 (colorat digital cu verde). În (B) este detaliu pentru zona încercuită cu alb punctat din Fig. 119, care prezintă vezicule acoperite cu clatrină (săgeți roșii) (colorate digital cu roz). În (C), telocitul TC2 face sinapse cu TC1 și o terminație nervoasă liberă (colorată digital cu albastru). CBC (după Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013).

❖ Joncțiuni heterocelulare

Lucrările recent publicate (Gherghiceanu și Popescu, 2012; Rusu și colab., 2012, a; Popescu și colab., 2005) au raportat că telocitele formează un tandem structural cu celulele mastocite. Celulele mastocite sunt considerate rezidenți ai țesuturilor constitutive și sunt jucători foarte importanți în fiziopatologie datorită cantității mari de mediatori inflamatori depuși în interiorul granulelor citoplasmice. Se pare că lipsa joncțiunilor heterocelulare telocite-celule mastocite din stroma tumorală poate fi implicată în supraexprimarea mediatorilor inflamatori. Limitarea joncțiunilor heterocelulare ale telocitelor sugerează o posibilă implicare în inducerea alterării comunicărilor celule-celule în stroma peritumorală și ulterior în întreaga masă tumorală, ceea ce favorizează comportamentul invaziv.

Investigațiile ultrastructurale în cazurile investigate de CBC au indicat prezența contactelor heterotipice ale telocitelor cu mastocite, cu celule musculare striate, cu macrofage (**Fig. 22**) și cu nervi periferici sau terminații nervoase libere (**Fig. 21**). Spre deosebire de pielea normală (Rusu și colab., 2012, a; Ceafalan și colab., 2012), am observat că, cu excepția unor contacte directe între telocite și macrofage, joncțiunile celulare homo- și heterotipice ale telocitelor sunt foarte limitate.

Carența numerică a telocitelor în sine, dar în special scăderea numerică a joncțiunilor heterocelulare pot fi asimilate cu pierderea funcției la nivelul homeostaziei tisulare (la nivel stromal). În cazurile investigate de CBC există o reducere a joncțiunilor heterotipice ale telocitelor cu

fibroblaști, celule mastocite, celule endoteliale, nervi și în consecință, anomalii ale regenerării și/sau reparării pielii (Moroșanu și colab., 2013).

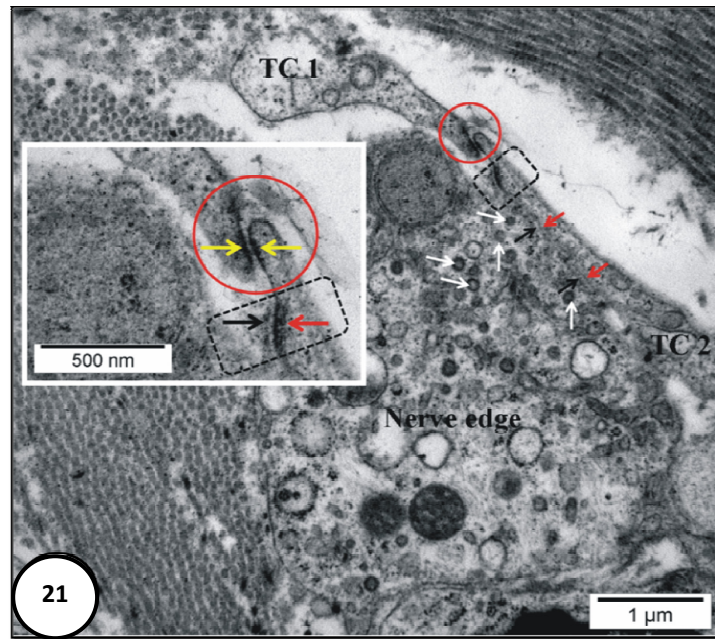


Fig. 21 - Două telocite (TC1 și TC2) sunt conectate prin joncțiune homocelulară (zonă încercuită). Sunt vizibile joncțiunile heterocelulare (pătratul punctat), inclusiv joncțiunile sinaptice dintre telocitul TC2 și o terminație nervoasă. În interiorul terminației nervoase, sunt vizibile vezicule presinaptice polimorfe (săgeți albe). Este vizibil un profil relativ lung al cleftului sinaptic ca o gaură îngustă de cca. 30-50 nm delimitat de axolema presinaptică (săgeți negre) și membrana plasmatică a telocitului 2 (săgeți roșii) în poziție celulară postsinaptică. În chenar: plăci electronodense (săgeți galbene) sunt vizibil atașate la fața internă a membranei plasmatică la nivelul joncțiunilor homocelulare. Săgeata roșie indică o placă electronodensă aparținând telocitului, în timp ce săgeata neagră indică o placă ușor densă atașată la membrana plasmatică a terminației nervoase. CBC (după Mirancea, Moroșanu și colab., 2013).

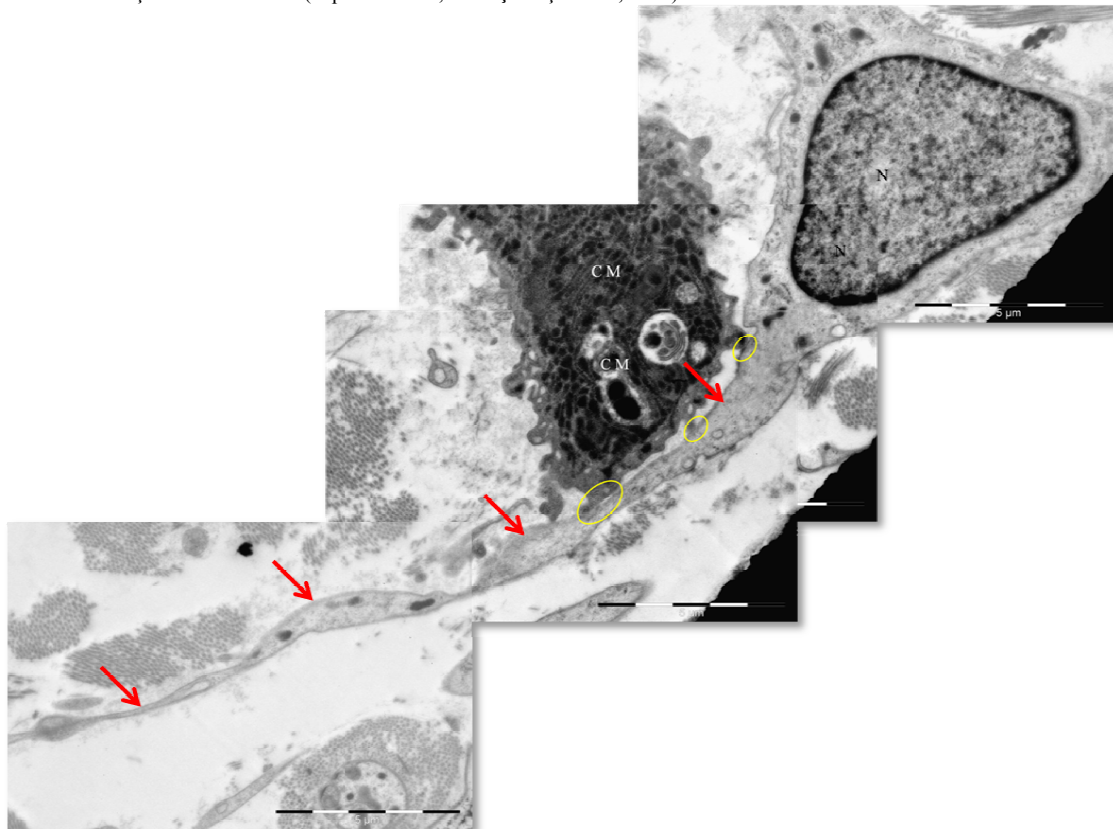


Fig. 22 – Relație heterotipică (cercuri galbene) între un telocit nucleat (N), stabilită între telopodul său și un macrofag. Proba T52. CBC.

2. Comunicarea indirectă celulă-celulă mediată de microvezicule membranare

Prin telopodele lor, telocitele eliberează microvezicule mici (diametru mediu de 180 nm) sub formă de microvezicule membranare singulare sau de rezervă (**Fig. 23**). Micro- și macromoleculele eliberate din microvezicule au rol paracrin, în semnalizarea pe distanțe lungi prin transmiterea de semnale la celulele vecine (Popescu, 2011; Gherghiceanu și Popescu, 2012). Microveziculele membranare sunt implicate în unele procese fiziopatologice prin traficul de suprafață al membranei și prin transferul pe orizontală al proteinelor și al ARN-urilor între celulele adiacente sau cele vecine - efecte paracrine în scopul de a efectua modificări rapide ale fenotipului necesare unei varietăți de condiții (Coccuci și colab., 2009).

Veziiculele extracelulare eliberate de către telocite pot juca un rol în comunicarea intercelulară, semnalizarea celulară și în menținerea homeostaziei tisulare (Mirancea, **Moroșanu** și colab., 2013; Crețoiu și Popescu, 2014).

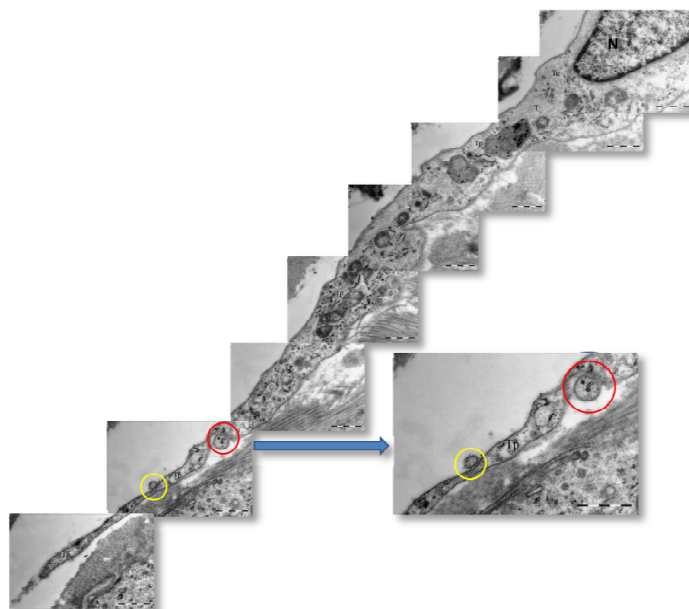


Fig. 23 – Imagine de ansamblu privind un telocit nucleat (N) în care se văd microvezicule în diferite stadii de eliberare în spațiul extracelular. În detaliu se vede o veziculă pe cale să fie detașată de plasmalema telocitului (cerc roșu) și alta deja detașată (cerc galben). Proba T52. CBC.

D. Investigarea alterărilor distribuției componentelor moleculare ale interfeței tumoră-stromă peritumorală prin IEM în CBC și CSC

În zona de joncțiune dermo-epidermică, în tegumentul normal, hemidesmozomii și membrana bazală contribuie fundamental la menținerea permanentă a adeziunii ferme a epidermului la derm.

În prezentul studiu, am acordat o atenție specială investigării alterărilor ultrastructurale ale hemidesmozomilor și de distribuție a diferitelor componente moleculare ale acestora atât în tumorile de carcinom bazocelular, cât și în carcinomul scuamocelular.

Pentru evaluarea corectă a alterărilor de distribuție a moleculelor esențiale care compun hemidesmozomii, am utilizat în paralel specimene de piele umană normală.

Pentru evaluarea distribuției componentelor moleculare ale hemidesmozomilor, mai bine zis a resturilor de joncțiuni hemidesmozomale care mai pot fi identificate la zona de afrontare a tumorilor cu stroma adiacentă, noi am procedat la urmărirea sistematică a acestora, evaluând prezența, distribuția ectopică sau absența totală a diferitelor molecule din compartimentul intracitoplasmatic, din zona transmembranară și din compartimentul extracelular (din stroma peritumorală adiacentă celulelor tumorale).

- **Pankeratina și Keratina 14**

Imunoelectronomicroscopia aplicată pe **pielea umană sănătoasă** a arătat reacții pozitive pentru **pankeratină** și **K14** a keratinocitelor bazale, atât în citoplasma superioară cât și în citoplasma bazală a acestora, ceea ce demonstrează o bună solidarizare a citoscheletului la hemidesmozomii de la polul bazal, condiție a menținerii polarității keratinocitului bazal și a homeostaziei epidermei normale.

Când imunoelectronomicroscopia a fost aplicată **în cazul tumorilor maligne de CBC și CSC, reacția imună pentru pankeratină și K14 este absentă în citoplasma polului bazal din unele celule adiacente stromei tumorale**. Absența semnalului în IEM pentru **pankeratină și K14 la acest nivel se corelează cu prezența invadopodiilor emise de celulele tumorale vizibile în TEM la interfața cu stroma adiacentă** ce conduce la alterarea polarității celulare, condiție a detașării din constrângerile tisulare și migrării acestor celule.

- **Plectina/HD1**

Analiza TEM a arătat că hemidesmozomii sunt defecienți pentru placa internă și, știind că **plectina** (numită și **HD1**) este o moleculă conectoare pentru filamentele de keratină, prin IEM am constatat că în timp ce în cazul epidermei sănătoase *in situ*, plectina (HD1) este detectabilă la nivelul plăcii interne a joncțiunii hemidesmozomale, aceasta este slab reprezentată (**Fig. 24**), ectopic localizată (**Fig. 25**) sau chiar absentă în cazul omoloagei celulare tumorale (CBC sau CSC) de la interfața cu stroma peritumorală. Lipsa plectinei explică de ce filamentele citoscheletice de keratină nu intră în invadopodii, ducând astfel la depolarizarea celulelor maligne și la facilitarea comportamentului invaziv. Migrarea individuală sau a maselor celulare este un proces foarte important în timpul morfogenezei, a vindecării rănilor, precum și în timpul invaziei aberante și a metastazelor celulelor maligne (Mirancea și Mirancea, 1998; Wang și colab., 2005; Margulis și colab., 2006; Breikreutz și colab., 2009; Mirancea și colab., 2009).

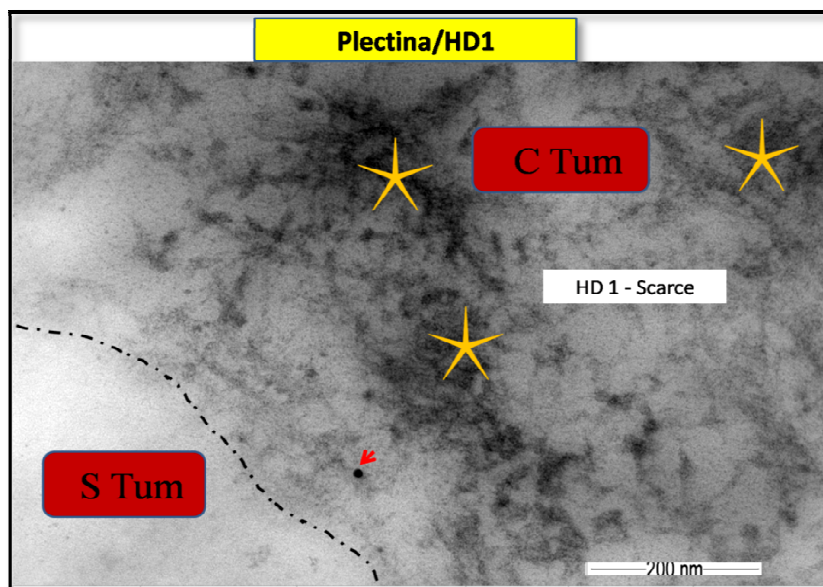


Fig. 24 - HD1/Plectina detectat prin imunoelectronmicroscopie apare slab reprezentat, localizat aproape de poziția normală (săgeată). Anticorp secundar conjugat cu aur coloidal de 10 nm. C Tum = celulă tumorală. S Tum = stromă tumorală. Steluțele galbene marchează filamentele citoscheletice de keratină. CBC (Manuscris în preparare).

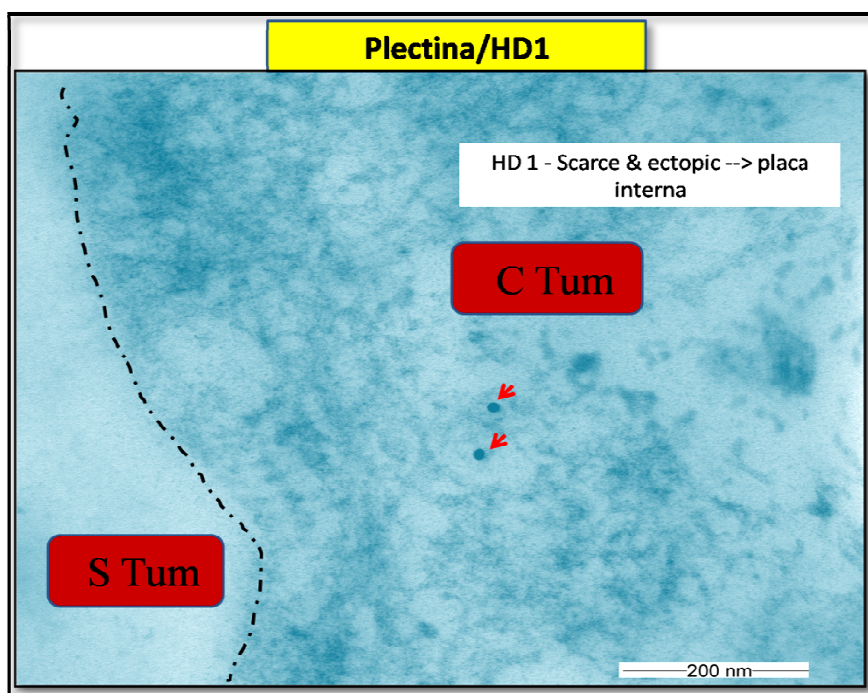


Fig. 25 - HD1/Plectina detectat prin imunoelectronmicroscopie este slab reprezentat și ectopic localizat, foarte departe de poziția normală, mult intracitoplasmatic (vârfuri de săgeți). Anticorp secundar conjugat cu aur coloidal de 10 nm. C Tum = celulă tumorală. S Tum = stromă tumorală. Filamentele citoscheletice de keratină sunt difuz orientate (imagine colorată digital cu albastru). CBC (Manuscris în preparare).

- **Integrina $\alpha 6 \beta 4$**

Reacția de imunodectție la nivel ultrastructural pentru integrina concomitentă pentru catena $\alpha 6$ și pentru catena $\beta 4$ la nivelul invadopodiilor din CSC a fost negativă, deși, așa cum se vede în **Fig. 26**, cel puțin pe anumite porțiuni ale invadopodului, încă se disting hemidesmozomi cu placa densă subbazală. La nivelul invadopodiilor care la examinarea TEM arată disoluții ale plasmalemei pe

porțiuni extinse, nu se mai pot detecta nici măcar resturi ale infrastructurilor hemidesmozomale, reacția imună este total absentă.

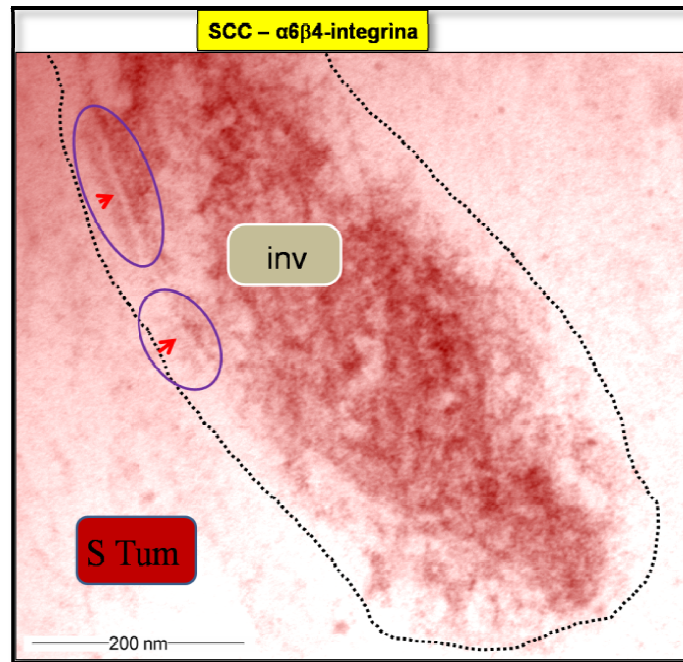


Fig. 26 - Detaliu privind un invadopodiu (inv) emis de către o celulă tumorală de carcinom scuamocelular în stroma peritumorală (S Tum). Plasmalema invadopodiului este distrusă încât limita dintre invadopodiu și stroma peritumorală este iluzivă (linia curbă punctată). Reacția de imunomarcare pentru integrina $\alpha6\beta4$ este negativă întrucât la nivelul resturilor de hemidesmozomi (zonele eliptice) din care se mai distinge placa densă sub-bazală marcată de vârful de săgeată, nu se detectează nici o particulă de aur coloidal (imagine colorată digital cu roz). CSC (Manuscris în preparare).

- **BPAG 2 (180 kDa)**

În pielea umană normală, BPAG 2 (180 kDa) prezintă trei segmente: (1) intracitoplasmatic, (2) transmembranar și (3) extracelular care intră în compoziția filamentelor hemidesmozomale. La zona de creștere invazivă a celulelor tumorale de CBC și CSC, reacția de imunodectie prin IEM este foarte slabă, cel mai adesea total negativă.

- **Laminina V (LN V)**

Reacția de imunodectie a lamininei 5 prin imunoelectronmicroscopie apare bine reprezentată ca intensitate și ca localizare la nivelul membranei bazale **în pielea normală**, dar a fost foarte slab reprezentată, cel mai adesea lipsind total de la zona de afrontare a celulelor tumorale invazive în stroma peritumorală, aspect care se corelează cu absența MB la examinarea TEM.

- **Colagenul de tip IV (Cg. IV)**

Reacția de imunodectie a colagenului de tip IV prin imunoelectronmicroscopie apare bine reprezentată ca intensitate și ca localizare la nivelul membranei bazale în pielea normală, prevalent distribuit în lamina densa a MB, uneori fiind focal detectat și mai profund sub MB. Acest din urmă

aspect corespunde cu existența unor placi mici de ancorare a unor fibrile de colagen de tip VII, fapt raportat în literatura de specialitate. Evaluarea reacției imune pentru colagen de tip IV în cazul CBC și a CSC prin IEM este similară cu cea obținută pentru laminină (a fost foarte slab reprezentată, cel mai adesea lipsind total de la zona de afrontare a celulelor tumorale invazive în stroma peritumorală). Desigur, și acest aspect s-a corelat cu absența MB descrisă anterior prin investigarea cu ajutorul TEM.

- **Colagenul de tip VII (Cg. VII)**

Reacția de imunomarcare pentru colagenul de tip VII aplicată fragmentelor de piele umană normală a dat un semnal pozitiv intens (**Fig. 27**) ceea ce arată că fibrele de ancorare a epidermului la derm sunt numeroase și asigură o soliditate puternică a ZJDE. Diferit de situația din țesutul cutanat normal, reacția de imunomarcare prin IEM a colagenului de tip VII, în fragmentele de țesut prelevat din tumori de CBC sau CSC la nivelul de contact dintre celulele tumorale și stroma tumorală este negativă ceea ce sugerează că sinteza și consolidarea fibrelor de ancorare reprezentate de colagenul de tip VII nu se realizează la frontul de creștere invazivă a protruziunilor tumorale în stroma adiacentă.

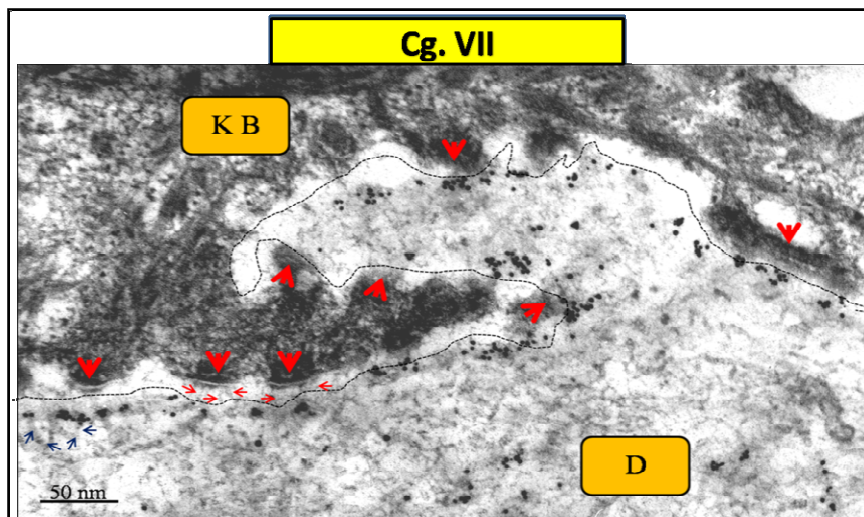


Fig. 27 - Reacția de imunomarcare identifică colagenul de tip VII (particulele electronodense de sub membrana bazală care se pot vedea și în dermul profund), constituent al fibrelor de ancorare a membranei bazale, implicat a keratinocitelor bazale (K B) la dermul subiacent (D). Pentru intensificarea semnalului s-a aplicat metoda de reacție imună indirectă urmată de reacția de autometalizare cu argint coloidal (*silver enhancement*). Linia punctată arată joncțiunea dermo-epidermică. Vârfulurile de săgeți indică joncțiunile hemidesmozomale, săgețile roșii marchează filamentele de ancorare, iar săgețile albastre indică fibrele de ancorare arcuate. Piele umană normală (Manuscris în preparare).

Din analiza comparativă a *pattern*-ului distribuției diverselor specii de molecule la nivelul ZJDE din pielea umană normală cu cea de la zona de creștere invazivă a tumorilor, mai ales la afrontarea unor celule tumorale cu stroma adiacentă, se constată că acesta este dramatic schimbat. Semnalul slab la imunodetecție care identifică sinteza diminuată cantitativ sau redistribuirea ectopică a anumitor proteine și glicoproteine de la nivelul joncțiunilor hemidesmozomale și a MB ori absența totală a acestora demonstrează clar că la frontul de creștere invazivă se produc perturbări severe în

cea ce privește sinteza unor molecule specifice implicate în menținerea integrității joncțiunilor hemidesmozomale și a membranei bazale.

CONCLUZII

Studiul efectuat în cadrul acestei teze de doctorat a făcut posibilă obținerea unor rezultate originale privind alterările ultrastructurale și moleculare dinamice relevante la nivelul interfeței tumoră-stromă peritumorală în cazul unor (1) **leziuni cutanate premaligne**, în (2) **carcinomul bazocelular (CBC)** și în (3) **carcinomul scuamocelular (CSC)**.

Am selectat și **analizat electronomicroscopic exhaustiv specimene de la pacienți diagnosticați cu CBC** cu un comportament invaziv și **CSC** cu cele mai semnificative alterări ultrastructurale care documentează modul în care celulele tumorale „construiesc” și expun mecanisme celular-moleculare de inițiere și susținere a invazivității și de migrare pentru a ocupa teritoriile ectopice (colonizarea unor țesuturi distante față de tumora primară) și de a genera tumori secundare (metastazare).

A. Leziuni cutanate premaligne:

- 1) Anomaliile ultrastructurale raportate în două cazuri de leziuni benigne (keratoză seboreică și hemangiom cavernos) în **tranziția spre fenotipul premalign** oferă un model *in situ* ce permite descifrarea modificărilor infrastructurale subtile care însoțesc transformarea malignă;
- 2) Analiza alterărilor severe ale zonei de joncțiune dermo-epidermice (**ZJDE**) în cazul de **keratoză seboreică (KS)** și al epiteliului epidermic displazic până la anaplazic ca un fenotip neobișnuit în cazul **hemangiomului cavernos (HC)** contribuie la o mai bună înțelegere a transformării maligne;
- 3) Aproape toate **keratinocitele din ZJDE și-au pierdut fenotipul epitelial**: joncțiunile desmozomale sunt deteriorate sau nu pot fi detectate, puține filamentele de citokeratină se mai conectează la aceste joncțiuni intercelulare;
- 4) La **interfața cu stroma** nu se pot detecta joncțiuni hemidesmozomale, iar membrana bazală lipsește;
- 5) **Capilarele** sunt mari și neregulate ca structură, cu pereți anormal de subțiri predispuși la extravazarea celulelor sanguine în interiorul stromei dermice, sub epidermul displazic spre anaplazic;
- 6) Am identificat pentru prima dată existența telocitelor și am descris relațiile homo- și heterocelulare pe care le realizează acestea în cazul **KS** și al **HC**.

B. Carcinoame cutanate nonmelanomice (CBC și CSC)

Examinările electronomicroscopice ale probelor de piele de la pacienți diagnosticați cu carcinom bazocelular (CBC) au arătat că keratinocitele transformate malign aflate la interfața cu stroma peritumorală pierd fenotipul caracteristic al keratinocitelor epidermice.

- 1) La interfața dintre stroma fibrotică și celulele epiteliale tumorale, **membrana bazală** (MB) și joncțiunile **hemidesmozomale** sunt sever alterate (pot fi detectate sub forma hemidesmozomilor rudimentari de tip II) sau lipsesc complet pe zone mari,
- 2) **joncțiunile desmozomale** sunt în mare parte profund alterate iar uneori, desmozomii sunt internalizați,
- 3) **conexiunea filamentelor intermediare de keratină cu plăcile desmozomale** este abolită încât filamentele citoscheletice pot fi văzute sub formă de mănunchiuri redistribuite perinuclear,
- 4) celulele tumorale de la interfața cu stroma emit **invadopodii**.
- 5) Investigațiile electronomicroscopice arată că unele celule tumorale prezintă o **fragilitate ridicată a membranei celulare**. Acest aspect anormal este documentat de numeroase imagini care au surprins disocieri/destructurări mai mult sau mai puțin extinse ale plasmalemei celulelor maligne, în special a celor aflate în contact cu stroma peritumorală.
- 6) Studiile noastre arată că fragilitatea membranei celulelor tumorale *in situ* poate culmina cu realizarea de **recombinări ale plasmalemei celulelor tumorale cu plasmalemele celulelor stromale normale** adiacente, rezultând **celule hibride maligne-normale** (celule himerice).
- 7) Noi considerăm că formarea unor celule hibride maligne-normale *in situ* urmare a recombinărilor de membrane mărește gradul de heterogenitate a tumorilor și de dificultate în terapia carcinoamelor cutanate.
- 8) Structuri veziculare numite **microvezicule extracelulare** sunt eliberate de către celulele tumorale la interfața tumoră-stromă.
- 9) **Capilarele** asociate tumorilor sunt uneori lipsite de membrană bazală și de pericite, prezintă fenestrații astfel încât celulele inflamatorii extravazate se amestecă cu celulele tumorale.
- 10) Am identificat și caracterizat din punct de vedere ultrastructural pentru prima dată așa-numitul „**conduit system**” în interiorul tumorilor de carcinom bazocelular delimitate de celule tumorale;
- 11) Fenotipul de „**conduit system**” identificat pentru prima dată de noi în carcinomul bazocelular este unul particular întrucât, diferit de alte „**conduit systems**” raportate până acum în literatura de specialitate în alte tipuri de țesuturi ca având o membrană bazală ce separă matricea fibrilară amorfă de restul țesutului, cel descris de noi nu prezintă o membrană bazală vizibilă, izolarea matricei sale fiind realizată de către celulele tumorale care încă sunt solidarizate între ele prin joncțiuni desmozomale și care formează pereții acestuia.

- 12) Prezența unui asemenea sistem de canale labirintice care apar ca o extensie a matricei peritumorale (conținutul matricei este format în principal din colagen fibrilar) în interiorul unei tumori rămâne un mister. Noi considerăm că prin extensia matricei peritumorale în interiorul tumorii se realizează furnizarea unor molecule matriceale de dimensiuni mici cu rol mesager, suport pentru creșterea și dezvoltarea celulelor tumorale.
- 13) **Examinarea comparativă** a ultrastructurii epiteliiilor tumorale *in situ* (carcinom bazocelular - **CBC** și carcinom scuamocelular – **CSC**) a scos în evidență faptul că alterările ultrastructurale înregistrate la interfața tumoră-stromă peritumorală în cazurile de carcinom bazocelular cu comportament invaziv (**plasticitatea crescută și fragilitatea ridicată a plasmalemei**) s-au regăsit și în cazurile de carcinom scuamocelular investigate de noi.
- 14) Pentru prima oară am identificat și investigat amplu **telocitul** – un fenotip particular de celulă stromală – în unele tumori benigne cu alterări infrastructurale cu aspect de leziuni premaligne și mai ales, în carcinomul bazocelular și carcinomul scuamocelular.
- 15) **Telocitele** sunt detectabile ca un fenotip distinct de celule interstițiale prezente în interiorul stromei tumorale din CBC, respectiv din CSC.
- 16) Telocitele, **prin conexiunile lor homo- și heterocelulare, formează o rețea 3-D în stroma tumorală**, care poate fi implicată în coordonarea semnalizării intercelulare pe distanțe lungi.
- 17) Prin intermediul sinapselor cu celulele stromale și al transferului de **microvezicule** (semnalizare celulară paracrină) telocitele joacă un rol important în semnalizarea intercelulară.
- 18) Comparativ cu situația din pielea normală, telocitele din CBC și CSC sunt capabile să stabilească **joncțiuni homocelulare**, dar un număr foarte restrâns de **joncțiuni heterocelulare**, ceea ce sugerează o posibilă implicare în inducerea alterării comunicărilor celule-celule în stroma peritumorală și ulterior în întreaga masă tumorală.
- 19) Este remarcabil faptul că atât în CBC cât și în CSC **telocitele sunt prevalent sechestrate în țesutul fibrotic dens, ceea ce pare să restricționeze relațiile heterotipice** pe care acestea ar putea să le stabilească cu alte tipuri celulare. Aceste aspecte sugerează perturbări ale homeostaziei țesutului epitelial transformat malign, așa cum apar în cazurile investigate în acest studiu.
- 20) Semnalăm cu prioritate observația noastră privind recombinația de membrane realizată între telocite și alte tipuri de celule stromale.
- 21) Relația **heterotipică pe care o manifestă telocitele cu mastocitele cutanate** apare ca fiind interesantă având în vedere că mastocitele sunt implicate într-un spectru larg de boli, în special cele legate de fibroproliferare și de neovascularizare.
- 22) Există evidențe morfologice care sugerează că, prin contactele lor heterocelulare cu mastocitele, telocitele joacă un rol în procesul de comunicare intercelulară prin degranularea mastocitelor și eliberarea de biomolecule active (*basic fibroblast growth factor* - o polipeptidă cu capacități angiogenice și mitogenice) în spațiul extracelular din micromediul peritumoral.

C. Alterările distribuției componentelor moleculare ale interfeței tumoră-stromă peritumorală în CBC și CSC

Examinarea imunoelectronomicroscopică (IEM) a făcut posibilă **identificarea alterărilor pattern-ului de distribuție a diferitelor specii moleculare de la interfața tumorilor de CBC și CSC cu stroma adiacentă.**

- a. Alterarea distribuției diferitelor molecule ale zonei de joncțiune tumoră-stromă peritumorală: Plectina/HD1, BPAG 1 (230 kD), BPAG 2 (180 kD), integrina $\alpha 6\beta 4$, laminina, Cg IV, Cg VII), care se manifestă prin (1) paucitatea acestora, (2) localizarea ectopică sau (3) absența totală **se corelează** cu alterarea diferitelor infrastructuri celulare, în principal cele hemidesmozomale, fapt ce conduce la schimbarea dramatică a **polarității** celulare, tendința de **detașare, migrare** și de **invazivitate** a celulelor tumorale în stroma peritumorală,
- b. Atât investigațiile de microscopie electronică în transmisie cât și cele de imunoelectronomicroscopie demonstrează că în cazul celulelor epiteliale aflate la stroma adiacentă, alterarea graduală până la pierderea joncțiunilor celule-celule și celule-matrice extracelulară, localizarea ectopică sau absența unor molecule conectoare cu citoscheletul și cu membrana bazală conduc la **depolarizarea** severă a celulelor epiteliale, condiție a detașării și migrării celulelor transformate malign.

Atât în cazurile de CBC invaziv cât și în cele de CSC, plasticitatea crescută și fragilitatea ridicată a plasmalemei celulelor tumorale care permit recombinații ale plasmalemelor, formarea de invadopodii, eliberarea de microvezicule (*shedding membrane vesicles*) și chiar dizolvarea focală a membranei plasmatică se corelează cu localizarea ectopică sau absența unor molecule conectoare hemidesmozomale (de ex. HD1/Plectina și BPAG 1) cu citoscheletul sau cu membrana bazală (de ex. BPAG 2, integrina $\alpha 6\beta 4$, colagenul de tip VII). Toate aceste modificări, precum și absența membranei bazale contribuie la **depolarizarea celulară** și sporesc capacitatea **invazivă** a celulelor tumorale din interiorul stromei peritumorale.

Identificarea și descrierea unor infrastructuri de tipul veziculelor **extracelulare generate de celulele tumorale și de telocitele din stroma peritumorală** contribuie la întărirea ipotezei potrivit căreia, prin conținutul lor molecular de *cargo* epigenetic pot contribui la transferul orizontal de informații pentru generarea și întreținerea stării de malignitate a tumorilor de CBC și CSC.

Rezultatele originale obținute în acest studiu de cercetare științifică fundamentală conținute în teza de doctorat contribuie la cunoașterea intimă a alterărilor celulare și moleculare care au loc la nivelul interfeței tumoră-stromă peritumorală cu implicare în manifestarea comportamentului invaziv al celulelor transformate malign.

O parte din rezultatele originale obținute au fost publicate în 5 lucrări științifice și sunt vizibile prin citările din literatura științifică internațională, iar o altă parte sunt cuprinse în 2 manuscrise în vederea publicării.

Bibliografie selectivă din bibliografia generală a tezei de doctorat

1. Aleksandrovych V., Walocha J.A., Gil K., *Telocytes in female reproductive system (human and animal)*, J. Cell Mol. Med., 20: 994-1000, 2016.
2. Aleksandrovych V., Pasternak A., Basta P., Sajewicz M., Walocha J.A., Gil K., *Telocytes: facts, speculations and myths*, Folia Med. Cracov., LVII(1): 5-22, 2017.
3. Aubrey B.J., Strasser A., Kelly G.L., *Tumor-suppressor functions of the tp53 pathway*, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 6:a026062, 2016.
4. Bastida-Ruiz D., Van Hoesen K, Cohen M., *The Dark Side of Cell Fusion*, Int. J. Mol. Sci., 17: 638, 2016.
5. Berenblum I., Shubik P., *A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin*, Br. J. Cancer, 1: 383-91, 1947.
6. Bissell M. J., Labarge M. A., *Context, tissue plasticity, and cancer: Are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?*, Cancer Cell, 7: 17-23, 2005.
7. Boos A.M., Weigand A., Brodbeck R., Beier J.P., Arkudas A., Horch R.E., *The potential role of telocytes in tissue engineering and regenerative medicine*, Semin. Cell Dev. Biol., 55: 70-78, 2016.
8. Bordianu A., Florescu I.P., Mureșan A., Bernad E., Craina M., Șargan I., *The squamous cell carcinoma at the level of the cephalic extremity: epidemiological, clinical and histopathological aspects*, Rom. J. Morphol. Embryol., 54(3 Supl): 901-904, 2013, a.
9. Bordianu A., Florescu I.P., Mureșan A., Bernad E., Craina M., Șargan I., *Anatomo-clinical aspects of the basal cell carcinoma at the level of the cephalic end*, Rom. J. Morphol. Embryol., 54(3): 609-612, 2013, b.
10. Bosco C., Diaz E., *Presence of telocytes in a non-innervated organ: the placenta*, Adv. Exp. Med. Biol., 913: 149-161, 2016.
11. Breathnach A.S., *Development and differentiation of dermal cells in man*, J. Invest. Dermatol., 71: 2-8, 1978.
12. Breitzkreutz D., Mirancea N., Nischt R., *Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?*, Histochem. Cell Biol., 132: 1-10, 2009.
13. Callen J.P., *Possible precursors to epidermal malignancies*, In: „Cancer to the skin”, Eds: Friedman R.J., Riegel D.S., Kopf A.W., Harris M.N., Baker D., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 27-34, 1991.
14. Cantarero C.I., Luesma B.M.J., Junquera E.C., *Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy*, J. Cell Mol. Med., 15: 26-30, 2011.
15. Chen T.Y., Morrison A.O., Cockerell C.J., *Cutaneous malignancies simulating seborrheic keratoses: An underappreciated phenomenon?* J. Cutan. Pathol., 44(9): 747-748, 2017.
16. Cigna E., Tarallo M., Maruccia M., Sorvillo V., Pollastrini A., Scuderi N., *Basal cell carcinoma: 10 years of experience*, J. Skin Cancer, 476362, doi: 10.1155/2011/476362, 2011.
17. Cișmașiu V., Popescu L.M., *Telocytes transfer extracellular vesicles loaded with microRNAs to stem cells*, J. Cell Mol. Med., 19(2): 351-358, 2015.
18. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J., *Shedding microvesicles: Artefacts no more*, Trends Cell Biol., 19: 43-51, 2009.
19. Constantin V.D., Mirancea G.V., Moroșanu A.M., Mirancea N., *Relevant infrastructural alterations in invasive pancreatic ductal adenocarcinoma.*, Rom. J. Morphol. Embryol., 56(1): 207-22, 2015.
20. Crețoiu D., Crețoiu S.M., Simionescu A.A., Popescu L.M., *Telocytes, a distinct type of cell among the stromal cells present in the lamina propria of jejunum*, Histol. Histopathol., 27: 1067-1078, 2012, (a).
21. Crețoiu S.M., Crețoiu D., Popescu L.M., *Human myometrium – the ultrastructural 3d network of telocytes*, J. Cell Mol. Med., 16: 2844-2849, 2012, (b).
22. Crețoiu S.M., Popescu L.M., *Telocytes revisited*, Biomol. Concepts, 5(5): 353-368, 2014.

23. Crețoiu D., Crețoiu S.M., *Telocytes in the reproductive organs: current understanding and future challenges*, Semin. Cell Dev. Biol., 55: 40-9, 2016.
24. Diculescu I., Onicescu D., Benga G., Popescu L.M., „Biologie celulară”, Editura Didactică și Pedagogică, 246 pag., București, 1983.
25. Dutta S., Warshall C., Bandyopadhyay C., Dutta D., Chandran B., *Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells*, PloS ONE, 9(5): e97580, 2014.
26. D'Souza-Schorey C., Clancy J.W., *Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers*, Genes Dev., 26: 1287-1299, 2012.
27. Dvorak H.F., *Tumors: wounds that do not heal*, N. Engl. J. Med., 315(26): 1650-1659, 1986.
28. Enăchescu C., *Carcinomul bazocelular. Caracteristici histochimice și imunohistochimice*, Ed. Academiei Române, București, pag. 91, 2015.
29. Fausson-Pellegrini M.S., Cortesini C., Romagnoli P., *Ultrastructure of the tunica muscularis of the cardiac portion of the human esophagus and stomach, with special reference to the so-called Cajal's interstitial cells*, Arch. Ital. Anat. Embriol., 82: 157-177, 1977.
30. Fausson-Pellegrini M.S., Popescu L.M., *Telocytes*, Biomol. Concepts, 2(6): 481-489, 2011.
31. Fitzpatrick T.B., Breathnach A.S., *The Epidermal Melanin Unit System*, Dermatol. Wochenschr., 147: 481-489, 1963.
32. Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.I., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. (6th ed.), New York, McGraw-Hill, 2 volumes, 3328 pages, ISBN: 0-07-138076-0, 2003.
33. Fronie A., Bunget A., Afrem E., Preoteșcu L.L., Pușcu D.C., Streba L., Mogoanta L., Dumitrescu D., *Squamous cell carcinoma of the oral cavity. Clinical and pathological aspects*, Rom. J. Morphol. Embryol., 54(2): 343-348, 2013.
34. Fusenig N.E., *Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro*, In: „The keratinocyte handbook”, Eds: Leigh I., Lane B., Watt F., Cambridge University Press, pp. 71-94, 1994.
35. Fusenig N.E., Skobe M., Vosseler S., Hansen M., Lederle W., Airola K., Tomakidi P., Stark H.-J., Steinbauer H., Mirancea N., Boukamp P., Breitkreutz D., *Tissue models to study tumor-stroma interaction*, In: „Proteases and their inhibitors in cancer and metastasis”, Eds: Ruth J., Foidart J.-M., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 205-223, 2002.
36. Gast C.E., Silk A.D., Zarour L., Riegler L., Burkhart J.G., Gustafson K.T., Parappilly M.S., *et al.*, *Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival*, Sci. Adv., 4 : eaat7828, 2018.
37. Gherghiceanu M., Popescu L.M., *Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification*, J. Cell Mol. Med., 9(4): 893-910, 2005.
38. Gherghiceanu M., Popescu L.M., *Cardiac telocytes – their junctions and functional implications*, Cell Tissue Res., 348(2): 265-279, 2012.
39. Hannafon B.N., Ding W.-Q., *Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer*, Int. J. Mol. Sci., 14: 14240-14269, 2013.
40. Heerboth S., Housman G., Leary M., Longacre M., Byler S., Lapinska K., Willbanks A., Sarkar S., *EMT and tumor metastasis*, Clin. Transl. Med., 4(1): 6, 2015.
41. Hinescu M.E., Gherghiceanu M., Suciul L., Popescu L.M., *Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy*, Cell Tissue Res., 343(2): 389-397, 2011.
42. Hornung J., Bohnert A., Phan-Thau L., Krieg T., Fusenig N.E., *Basement membrane formation by malignant mouse keratinocyte cell lines in organotypic culture and transplants: correlation with degree of morphologic differentiation.*, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 113: 325-341, 1987.

43. König L., Mairinger F. D., Hoffmann O., Bittner A.-K., Schmid K.W., Kimmig R., Kasimir-Bauer S., Bankfalvi A., *Dissimilar patterns of tumor-infiltrating immune cells at the invasive tumor front and tumor center are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer*, BMC Cancer, 19:120, 2019.
44. Lee T.H., D'Asti E., Magnus N., Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J., *Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular debris*, Semin. Immunopathol., 33: 355-467, 2011.
45. Li M., Urmacher C.D., *Normal Skin*, In: “Histology for Pathologists”, Eds.: Mills S.E., Sternberg S., 3rd Edition, Lippincott Williams and Wilkins, 53 pgs, 2007.
46. Lukashev ME, Werb Z., *ECM signalling orchestrating cell behaviour and misbehaviour*, Trends Cell Biol., 8(11): 437-441, 1998.
47. Manetti M., Rosa I., Messerini L., Guiducci S., Matucci-Cerinic M., Ibba-Manneschi L., *A loss of telocytes accompanies fibrosis of multiple organs in systemic sclerosis*, J. Cell Mol. Med., 18(2): 253-262, 2014.
48. Manole C.G., Cişmasiu V., Gherghiceanu M., Popescu L.M., *Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis*, J. Cell Mol. Med., 15(11): 2284–2296, 2011.
49. Manole C.G., Gherghiceanu M., Simionescu O., *Telocyte dynamics in psoriasis*, J. Cell Mol. Med., 22(10): 1504-1519, 2015.
50. Mirancea D., Mirancea N., *Dynamics of the cell–cell and cell basement membrane junctions during skin ontogenesis*, Rev. Roum. Bio.l – Série Biol. Anim., 42(1): 31–40, 1997.
51. Mirancea N., Mirancea D., Juravle F.D., Şerban A.-M., Mirancea G.-V., *Epithelial-stromal interactions during tumorigenesis and invasion process of basocellular and squamous cell carcinomas at the tumor-peritumoral stroma interface*, Rom. J. Biol. – Zool., 54(1): 97–120, 2009.
52. Mirancea N., Mirancea D., “Ultrastructura celulelor și tesuturilor”, 703 pgs., Editura Ars Docendi – Universitatea din București, București, 2010, (a).
53. Mirancea N., Mirancea D., *Rolul interacțiunilor gene-mediului în etiologia cancerului uman*, In: “Impactul factorilor de mediu asupra biodiversității”, Academia Română, Institutul de Biologie București, Editura Academiei Române, București, 2010, (b).
54. Mirancea N., Mirancea G.-V., Moroşanu A.-M., Juravle F.D., Mirancea D., *Infrastructural and molecular tumor-extracellular matrix interface alterations in the basocellular and squamous cell carcinoma development*, Rom. J. Biol. – Zool., 55(1): 95-109, 2010.
55. Mirancea N., Moroşanu A.-M., Juravle F.D., Mirancea G.-V., Trandaburu I., Mănoiu V.-S., *Relevant infrastructural alterations as premalignant lesions during benign tumors development*, Rom. J. Biol.- Zool., 56(1): 95-112, 2011.
56. Mirancea N., Moroşanu A.M., Mirancea G.V., Juravle F.D., Mănoiu V.S., *Infrastructure of the telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas*, Rom. J. Morphol. Embryol., 54(4): 1025-1037, 2013.
57. Mirancea N., *Telocyte – a particular cell phenotype. Infrastructure, relationships and putative functions*, Rom. J. Morphol. Embryol., 57(1): 7–21, 2016.
58. Moroşanu A.-M., Mirancea G.-V., Juravle F.D., Mirancea N., *Cell-cell and cell-extracellular matrix junctions alteration are prerequisite for tumor progression in the human basal cell carcinoma*, Rom. J. Biol.-Zool., 58(1): 75-91, 2013.
59. Murnyak B., Hortobagyi T., *Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer*, Oncotarget, 7(40): 64910-64920, 2016.
60. Neve A., Cantatore F.P., Maruotti N., Corrado A., Ribatti D., *Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions*, BioMed Res. Internat., article ID 756078, 10 pages, doi:10.1155/2014/756078, 2014.
61. Nicolescu M.I., Popescu L., *Telocytes in the interstitium of the human exocrine pancreas: ultrastructural evidence*, Pancreas, 41(6): 949–956, 2012.
62. Păiș V., “Ultrastructura pielii umane (în condiții normale și patologice)”, Ed. Medicală, București, 128 pgs, 1983.

63. Petrescu I.R., Sajin M., Costache M., Simion G., *Basal cell carcinoma miming cutaneous melanoma*, Rom. J. Morphol. Embryol., 52(1): 197-201, 2011.
64. Ploaie P.G., Petre Z., *Introducere în microscopia electronică*, Ed. Academiei RSR, București, 1979.
65. Popescu L.M., Gherghiceanu M., Crețoiu D., Radu E., *The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ*, J. Cell. Mol. Med., 9(3): 714-730, 2005.
66. Popescu L.M., Faussone-Pellegrini M.S., *Telocytes – a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via interstitial Cajal-like cells (ICLC) to telocytes*, J. Cell Mol. Med., 14(4): 729-740, 2010.
67. Popescu L.M., *The tandem: telocytes-stem cells*, Int. J. Biol. Biomed. Eng., 5: 83-92, 2011.
68. Popescu L.M., Fertig E.T., Gherghiceanu M., *Reaching out: junctions between cardiac telocytes and cardiac stem cells in culture*, J. Cell Mol. Med., 20: 370-380, 2016.
69. Radu B.M., Banciu A., Banciu D.D., Radu M., Crețoiu D., Crețoiu S.M., *Calcium signaling in interstitial cells: focus on telocytes*, Int. J. Mol. Sci., 18: 397, doi:10.3390/ijms18020397, 2017.
70. Ramon y Cajal S., „*Histologie du système nerveux de l’homme et des vertèbres*”, Vol. 2, Paris, France: A. Maloine, 1911.
71. Roatesi I., Radu B.M., Crețoiu D., Crețoiu S.M., *Uterine telocytes: a review of current knowledge*, Biol. Reprod., 93(1): 10, 2015.
72. Rusu M.C., Mirancea N., Mănoiu V.S., Vâlcu M., Nicolescu M.I., Păduraru S., *Skin telocytes*, Ann. Anat., 194(4): 359-367, 2012, (a).
73. Rusu M.C., Jianu A.M., Mirancea N., Didilescu A.C., Mănoiu V.S., Păduraru D., *Tracheal telocytes*, J. Cell Mol. Med., 16(2): 401-405, 2012, (b).
74. Samarasinghe V., Madan V., *Nonmelanoma skin cancer*, 5(1): 3-10, 2012.
75. Siriwardena, S.B.S.M., Tsunematsu T., Qi G., Ishimaru N., Kudo Y., *Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma—A review*, Int. J. Mol. Sci., 19(5): 1462, 2018.
76. Slaughter D.P., Southwick H.W., Smejkal W., “*Field cancerization*” in oral stratified squamous epithelium. *Clinical implications of multicentric origin*, Cancer, 6(5): 963-968, 1953.
77. Smith L.T., Holbrook K.A., Madri J.A., *Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin*, Am. J. Anat., 175: 507-521, 1986.
78. Smythies J., *Intercellular signaling in cancer – the SMT and TOFT hypotheses, exosomes, telocytes and metastases: is the messenger in the message?* J. Cancer, 6(7): 604-609, 2015.
79. Song D., Crețoiu D., Zheng M., Quian M., Zhang M., Crețoiu S.M., Chen L., Fang H., Popescu LM, Wang X, *Comparison of chromosome 4 gene expression profile between lung telocytes and other local cell types*, J. Cell Mol. Med., 20: 71-80, 2016, (a).
80. Song D., Crețoiu D., Crețoiu S.M., Wang X., *Telocytes and lung disease*, Histol. Histopathol., 31: 1303-1314, 2016, (b).
81. Steopoe I., „*Histologie și Embriologie*”, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1962.
82. Urechescu H.C., Balica N.C., C.A. Sarău, Anghelina F., Horhat I.D., Baderca F., Jifcu E.M., Ștefănescu, E.H., Poenaru M., Pricop M.O., *Basal cell carcinoma and basosquamous carcinoma, two faces of the same condition?* Rom. J. Morphol. Embryol., 59(3):989-996, 2018.
83. Vannucchi M.G., Traini C., *Interstitial cells of Cajal and telocytes in the gut: twins, related or simply neighbor cells?* BioMol Concepts, 7(2): 93-102, 2016.
84. Weaver V.M., Petersen O.W., Wang F., Larabell C.A., Briand P., Damsky C., Bissell M.J., *Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in threedimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies*, J. Cell Biol., 137: 231-245, 1979.
85. Zheng Y., Crețoiu D., Yan G., Crețoiu S.M., Popescu L.M., Fang H., Wang X, *Protein profiling of human lung telocytes and microvascular endothelial cells using iTRAQ quantitative proteomics*, J. Cell Mol. Med., 18: 1035-1059, 2014.

Lucrări științifice publicate în tematica tezei de doctorat

1. Mirancea N., Mirancea D., Juravle F.D., **A.-M. Șerban**, Mirancea G.-V., **2009**, *Epithelial-stromal interactions uring tumorigenesis and invasion process of basocellular and squamous cell carcinomas at the tumor-peritumoral stroma interface*, Rom. J. Biol. – Zool., **54**(1): 97-120.
2. Mirancea N., Mirancea G.-V., **Moroșanu A.-M.**, Juravle F.D., Mirancea D., **2010**, *Infrastructural and molecular tumor-extracelular matrix interface alterations in the basocellular and squamous cell carcinoma development*, Rom. J. Biol. – Zool., **55**(1): 95-109.
3. Mirancea N., **Moroșanu A.-M.**, Juravle F.D., Mirancea G.-V., Trandaburu I., Mănoiu V.-S., **2011**, *Relevant infrastructural alterations as premalignant lesions during benign tumors development*, Rom. J. Biol.- Zool., **56**(1): 95-112.
4. **Moroșanu A.-M.**, Mirancea G.-V., Juravle F.D., Mirancea N., **2013**, *Cell-cell and cell-extracellular matrix junctions alteration are prerequisite for tumor progression in the human basal cell carcinoma*, Rom. J. Biol.- Zool., **58**(1): 75-91.
5. Mirancea N., **Moroșanu A.-M.**, Mirancea G.-V., Juravle F.D., Mănoiu V.S., **2013**, *Infrastructure of telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas*, Rom. J. Morphol. Embryol., **54**(4): 1025-1037.