



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00644**

(22) Data de depozit: **14/10/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(71) Solicitant:
• **SPITALUL UNIVERSITAR DE URGENȚĂ
MILITAR CENTRAL "DR.CAROL DAVILA"
BUCUREȘTI, STR. MIRCEA VULCĂNESCU
NR. 88, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CARUNTU ANA, STR. DREPTĂȚII, NR.65,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TANASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **CARUNTU CONSTANTIN, STR.ȘTIRBEI
VODĂ, NR.150, BL.26C, SC.1, AP.18,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE EVALUARE A RISCULUI PROGNOSTIC
ÎN CANCERUL DIN SFERA ORO- MAXILO-FACIALĂ BAZAT
PE VALORILE SERICE ALE FIBRINOGENULUI
ȘI RAPORTULUI PLACHETE- LIMFOCITE**

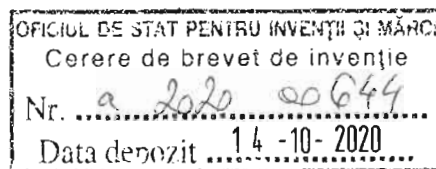
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de evaluare a riscului prognostic în cancerul din sfera oro-maxilo- facială. Procedeu, conform invenției, constă în determinarea la momentul diagnosticului, înainte de inițierea terapiei, a parametrilor biologici inflamatori și imuni din circulația periferică implicați în procesul de carcinogeneză, și anume fibrinogen seric și raportul trombocite-limfocite (PLR), la un lot de pacienți cu evoluție favorabilă (OS) față de un lot de pacienți cu evoluție nefavorabilă (DRD), stabilirea unei valori prag pentru fibrinogen de 500 mg/dL, respectiv, pentru PLR de 125, clasificarea

pacienților în grupuri în funcție de valorile prag stabilite, analiza comparativă a corelațiilor celor doi parametri cu supraviețuirea pentru fiecare dintre grupuri și potențialul cumulativ prognostic pentru ambele criterii evaluate simultan, cu identificarea a două clase de risc și încadrarea pacienților în aceste clase și definirea categoriilor de risc prognostic în funcție de care se selectează subiecții cu risc crescut de evoluție nefavorabilă în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială.

Revendicări: 2





42

**PROCEDEU DE EVALUARE A RISCULUI PROGNOSTIC IN CANCERUL DIN
SFERA ORO-MAXILO-FACIALA BAZAT PE VALORILE SERICE ALE
FIBRINOGENULUI SI RAPORTULUI PLACHETE-LIMFOCITE**

Autori: Caruntu Ana, Tanase Cristiana, Caruntu Constantin

Prezenta invenție “Procedeu de evaluare a riscului prognostic in cancerul din sfera oro-maxilo-faciala bazat pe valorile serice ale fibrinogenului si a raportului plachete-limfocite” a avut in vedere analiza parametrilor biologici inflamatori si imuni din circulatia periferica fiind focusat pe elementele implicate în răspunsul imun sistemic, în inflamația sistemică și angiogeneză, toate cu rol major în procesul de carcinogeneză. Analiza comparativă a parametrilor biologici determinați preoperator la lotul de pacienți cu evoluție favorabilă (OS) față de cei care au decedat din cauza bolii (DRD) a pus în evidență diferențe semnificative statistic între cele două grupuri pentru o serie de elemente: fibrinogenul seric, trombocite (PLT), raportul limfocite/leucocite (Ly%), raportul trombocite/limfocite (PLR). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabel 1).

Tabel 1. Analiza comparativă a parametrilor biologici sangvini între supraviețuitori (OS) și decedați din cauza bolii (DRD) în lotul total

	OS		DRD		Valoare p	Test
	Valoare medie	SD	Valoare medie	SD		
Fibrinogen	484.80	116.30	580.80	138.50	0.0001	^
WBC	8.26	2.36	9.00	2.48	0.1189	*
LY%	25.80	7.17	22.26	6.96	0.0138	*
LY#	2.03	0.57	1.97	0.77	0.6319	*
PLT	248.30	77.62	304.70	141.70	0.0089	^
PLR	131.10	57.97	167.10	72.98	0.0037	^

Tabel 1. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie plus deviație standard (SD). * Testul T (student) pentru valorile cu distribuție normală (Gaussiană). ^ Testul Mann-Whitney pentru valorile fără distribuție Gaussiană. Semnificație statistică $p < 0.05$

Valorile fibrinogenului seric determinat preoperator s-au încadrat în intervalul de limite normale la mai puțin de o treime dintre pacienți, 29% (interval biologic de referință 276-471 mg/dL). Restul pacienților au avut fibrinogenul seric în afara limitelor normale, depășind limita superioară, cu excepția a 4 pacienți la care valorile au fost sub limită. Valoare medie determinată preoperator la lotul de pacienți cu evoluție nefavorabilă (DRD) a fost de 581 mg/dL, semnificativ crescută față de valorile din grupul pacienților supraviețuitori (OS), la care media a fost de 485 mg/dL ($p=0.0001$) (Fig 1).

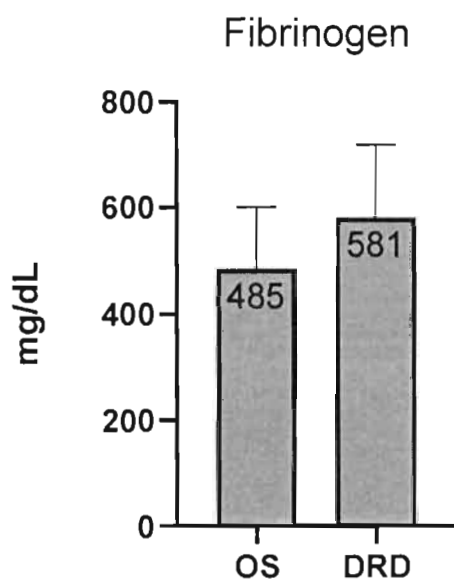


Fig 1 Fibrinogenul seric

Analiza raporturilor intercelulare în circulația periferică a evidențiat diferențe importante între cele două loturi. Astfel, raportul dintre neutrofile și limfocite (NLR) a avut o valoare semnificativ mai mare la subiecții care au decedat din cauza bolii, cu o valoare medie de 3.47 față de 2.88 la lotul de supraviețuitori ($p=0.0206$). Puterea semnificației statistice a crescut pentru raportul plachete-limfocite (PLR), unde valoarea medie la subiecții la care a survenit decesul din cauza bolii a fost de 167 față de 131 la subiecții care au evoluat favorabil ($p=0.0037$) (Fig 2.)

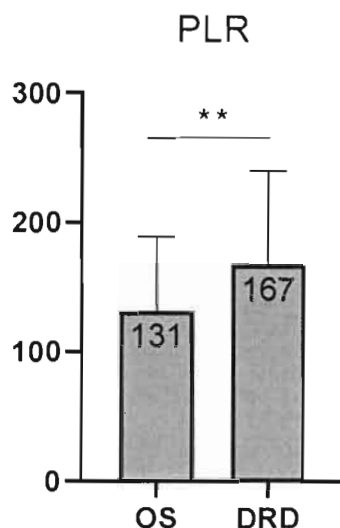


Fig 2. Raportul PLR

Evaluările prezentate mai sus au permis identificarea a doi parametri biologici determinați din sângele periferic, fibrinogenul și raportul trombocite-limfocite (PLR), care au demonstrat diferențe semnificative statistic în cazul evoluției nefavorabile atât la grupul total de pacienți cât și la subgrupul de pacienți cu boală avansată loco-regional. Aceleași două elemente au păstrat diferențele semnificative statistic și în analiza comparativă dintre formele incipientă și avansată ale bolii. Atât fibrinogenul cât și raportul PLR au avut valori mai mari la pacienții cu evoluție nefavorabilă, indiferent de extensia bolii, precum și la cei cu boala avansată loco-regional.

S-a evaluat la lotul total de pacienți, cei doi parametri biologici, fibrinogen seric și PLR, utilizând analiza curbei ROC pentru a stabili valoarea prag optimă de diferențiere a rezultatelor pozitive de cele negative din punct de vedere al caracterului prognostic. Pentru fibrinogenul seric s-a obținut o valoare a ariei de sub curbă (AUC) de 0.7203, în timp ce pentru PLR valoarea AUC calculată a fost de 0.6660. Rezultatele analizei curbelor ROC pentru fibrinogen și PLR sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabel 2.).

Tabel 2. Fibrinogen seric și PLR: analiza ROC

	Fibrinogen	PLR
Aria de sub curba (AUC)	0.7203	0.666
Eroarea Standard	0.05625	0.05594

Intervalul de confidență 95%	0.6100 to 0.8305	0.5563 to 0.7756
Valoarea p	0.0001	0.004

Tabel 2. Analiza curbei ROC pentru fibrinogenul seric și PLR. Valorile conțin eroarea standard și intervalul de confidență. Semnificație statistică $p < 0.05$

Pe baza analizei curbelor ROC, au fost selectate valorile prag pentru fibrinogen și PLR, urmărindu-se obținerea de valori optime ale sensibilității și specificității testului. Au fost selectate valorile prag cu o sensibilitate mai mare, pentru a identifica un număr cât mai mare de subiecți cu risc de evoluție nefavorabilă, păstrând în același timp valorile specificității la cote optime. Astfel, am stabilit nivelul de cut-off pentru fibrinogenul seric la valoare de **500 mg/dL**, iar pentru PLR a fost stabilit de cut-off la **125**. Rezultatele analizei curbelor ROC în vederea stabilirii valorilor de cut-off sunt prezentate în tabelul și figurile de mai jos (Tabel 3, Fig. 3 și 4).

Tabel 3: Fibrinogen și PLR: valorile prag

	Fibrinogen	PLR
Valoare prag	> 499.5	> 124.2
Sensibilitatea %	72.73	72.73
Intervalul de confidență 95%	55.78% to 84.93%	55.78% to 84.93%
Specificitatea%	60.58	56.07
Intervalul de confidență 95%	50.97% to 69.43%	46.62% to 65.11%
Raportul de probabilitate	1.845	1.656

Tabel 1.8: Sensibilitatea și specificitatea, intervalul de confidență și raportul de probabilitate pentru fibrinogenul seric și PLR

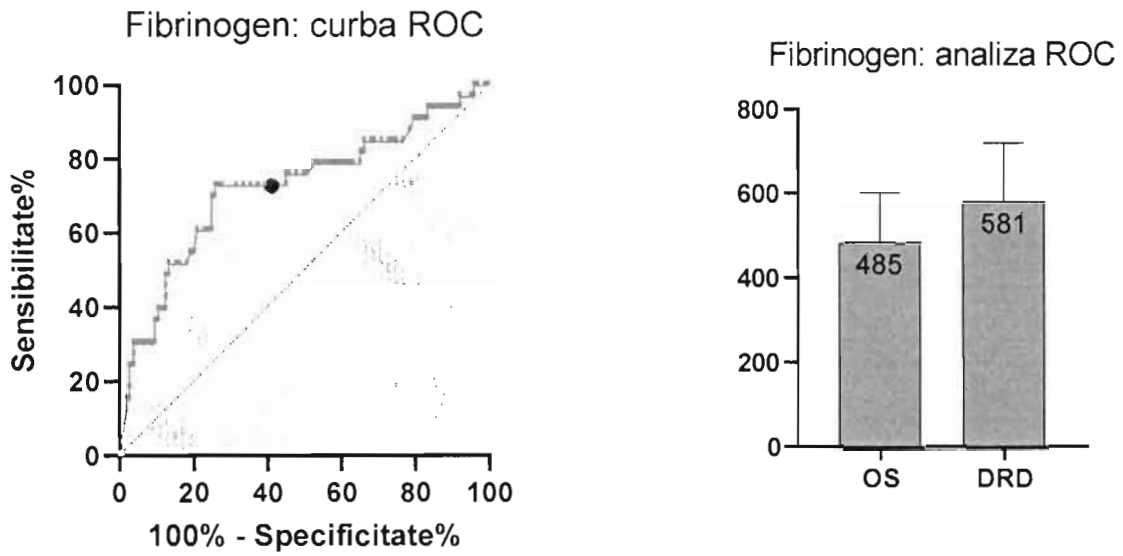


Fig 3. Fibrinogenul seric: curba ROC

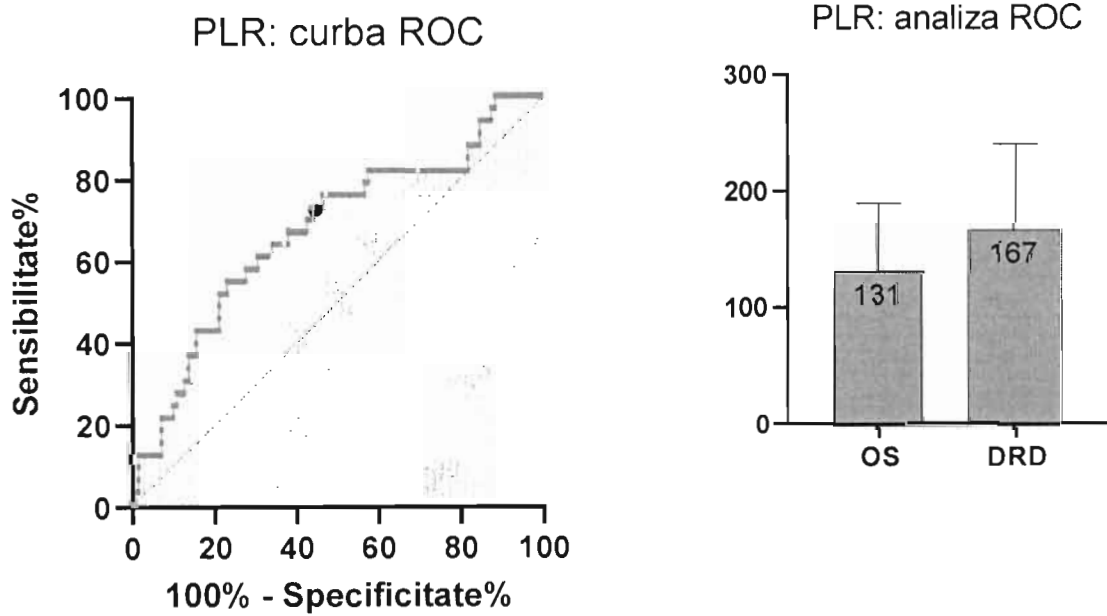


Fig 4. PLR: curba ROC

Pentru analiza corelațiilor celor doi parametri cu supraviețuirea în lotul total de pacienți s-a utilizat metoda Kaplan-Meier. Astfel, clasificând pacienții într-un grup cu valori ale fibrinogenului seric mai mari sau egale cu 500 mg/dL și un al doilea grup cu valori mai mici de 500 mg/dL, s-au analizat curbele de supraviețuire pentru fiecare dintre grupuri. Pe același principiu s-au analizat și corelațiile cu supraviețuirea la grupul de pacienți cu valori ale PLR mai mari sau egale cu 125 și grupul cu valorile PLR mai mici decât 125. Rezultatele obținute au fost validate prin testul Log-rank și testul Wilcoxon și sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabel 4.).

Tabel 4. Analiza Kaplan Meier pentru fibrinogenul seric și PLR în lotul total

	Chi square	df	Valoarea P	Puterea semnificației statistice
Fibrinogen				
Testul Log-rank (Mantel-Cox)	9.855	1	0.0017	**
Testul Gehan-Breslow-Wilcoxon	10.53	1	0.0012	**
PLR				
Testul Log-rank (Mantel-Cox)	7.815	1	0.0052	**
Testul Gehan-Breslow-Wilcoxon	8.087	1	0.0045	**

Tabel 4.: Testul Logrank și Wilcoxon pentru fibrinogenul seric și PLR în lotul total de pacienți. Semnificație statistică $p < 0.05$

Curbele de supraviețuire în lotul total de pacienți arată diferențe intens semnificative statistic corelate cu valori ale fibrinogenului seric ≥ 500 mg/dL ($p=0.0017$), precum și cu valori ale PLR ≥ 125 ($p=0.0052$). (Fig 5 și 6).

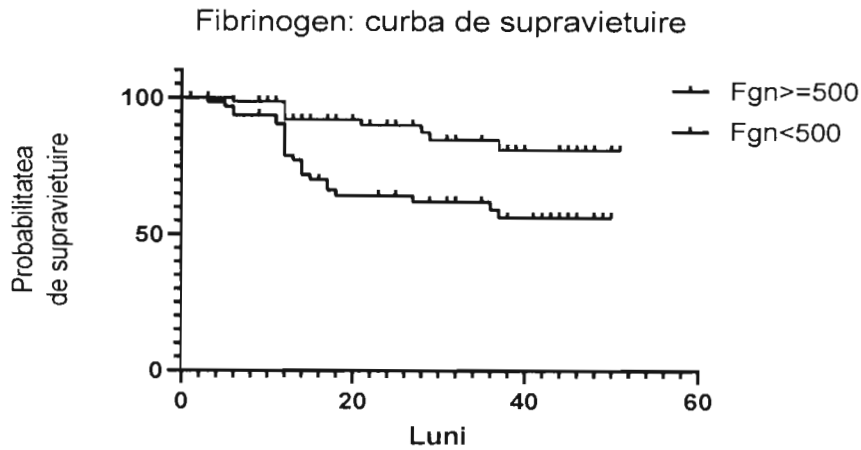


Fig 5. Fibrinogenul seric: curba de supravietuire

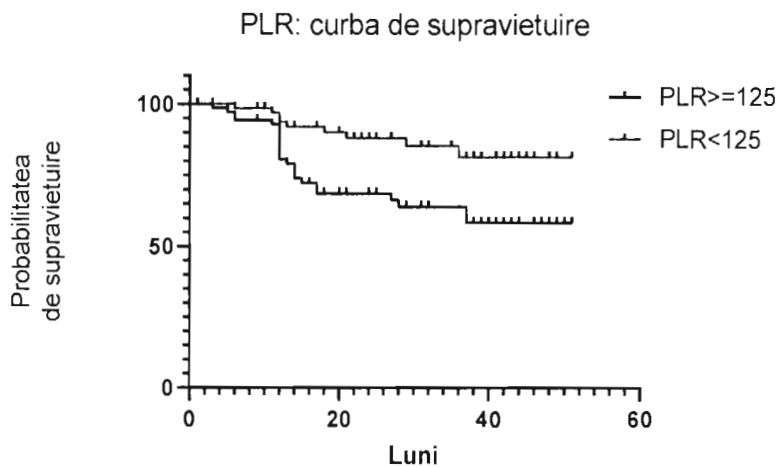


Fig 6. PLR: curba de supravietuire

Procedeu de evaluare a riscului prognostic in cancerul din sfera oro-maxilo-faciala bazat pe valorile serice ale fibrinogenului si a raportului plachete-limfocite.

Rezultatele obținute în urma analizelor prezentate mai sus, prin care este susținut caracterul predictiv al fibrinogenului seric și PLR în carcinomul spinocelular din sfera oro-maxilo-facială, a condus către propunerea unui procedeu cu rol prognostic determinat precoce, care să includă cei doi parametri biologici: fibrinogenul seric și raportul trombocite-limfocite (PLR) în evaluarea pacienților cu această boală, pe care l-am denumit: **Procedeu de evaluare a riscului prognostic**

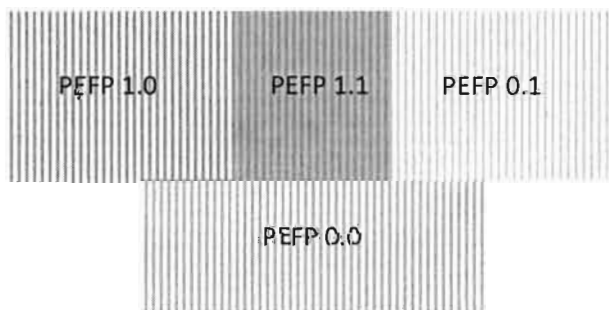
in cancerul din sfera oro-maxilo-faciala bazat pe valorile serice ale fibrinogenului si a raportului plachete-limfocite, sau prescurtat: "Procedeu de evaluare a riscului prognostic Fibrinogen-PLR" - (PEFP)

"Procedeu de evaluare a riscului prognostic Fibrinogen-PLR" - (PEFP), în evaluarea prognosticului la pacienții cu carcinom spinocelular în sfera oro-maxilo-facială propune încadrarea acestora în diferite clase de risc, în funcție de valorile fibrinogenului și ale PLR-ului la momentul diagnosticului, înainte de inițierea terapiei.

Valoarea prag pentru fibrinogenul seric este ≥ 500 mg/dL sau < 500 mg/dL, iar pentru raportul PLR este ≥ 125 , respectiv < 125 . În funcție de aceste valori pacienții din studiul au fost împărțiți în patru loturi: lotul de pacienți cu ambii parametri peste valoarea prag (PEFP 1.1), două loturi de pacienți care aveau doar câte un parametru peste valoarea prag (PEFP 1.0 pentru fibrinogen și PEFP 0.1 pentru PLR) și lotul de pacienți care nu au depășit pentru nici un parametru valoarea prag (PEFP 0.0). Cele patru loturi sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabel 5).

Tabel nr 5: Clasele AFP

Clasele PEFP	Fibrinogen seric	PLR
PEFP 1.1	≥ 500 (mg/dL)	≥ 125
PEFP 1.0	≥ 500 (mg/dL)	≥ 125
PEFP 0.1	< 500 (mg/dL)	< 125
PEFP 0.0	< 500 (mg/dL)	< 125



PEFP

Utilizând metoda Kaplan-Meier s-au analizat curbele de supraviețuire pentru pacienții din cele patru clase AFP. Rezultatele obținute au arătat diferențe semnificative statistic între grupurile analizate și sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabel 6 și Fig 7).

Tabel 6 PEFP în lotul total de pacienți: analiza Kaplan Meier

	Chi square	df	Valoarea P	Puterea semnificației statistice
Testul Log-rank (Mantel-Cox)	19.39	3	0.0002	***
Testul Logrank pentru trend	15.37	1	<0.0001	****
Testul Gehan-Breslow-Wilcoxon	19.02	3	0.0003	***

Tabel 6: Semnificație statistică $p < 0.05$

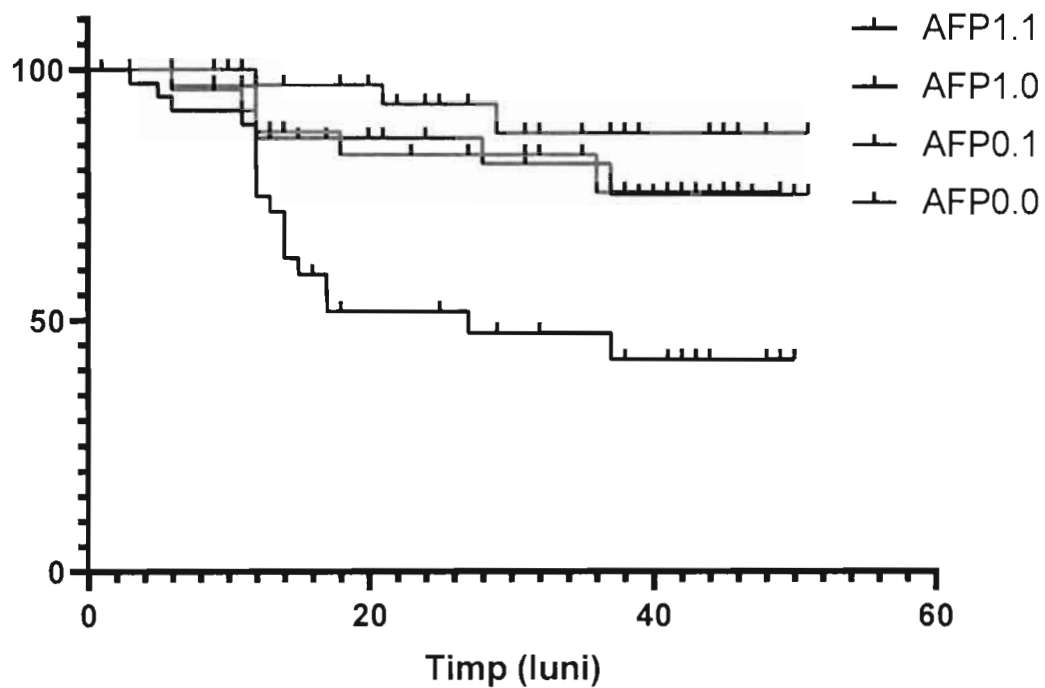


Fig 7 Procedul PEFP: curba de supraviețuire

Pentru definirea categoriilor de risc prognostic în cadrul PEFP s-au analizat comparativ în corelațiile dintre subgrupurile definite de algoritm și supraviețuire, precum și dintre fiecare subgrup și restul pacienților.

Astfel, pe baza diferențelor cu semnificație statistică din cadrul analizei efectuate s-au identificat două clase de risc în funcție de valorile preoperatorii ale celor doi parametri sangvini. Subiecții care au avut valori peste nivelul prag atât pentru fibrinogenul seric cât și pentru PLR au asociat un risc semnificativ mai mare de evoluție nefavorabilă față de toate celelalte clase, analizate individual sau în ansamblu (PEFP 1.0, PEFP 0.1, PEFP 0.0). Analiza supraviețuirii claselor care întrunesc un criteriu, dar îl exclud pe celălalt (PEFP 1.0 și PEFP 0.1), nu au arătat diferențe semnificative față de grupul dublu negativ (PEFP 0.0) (Tabel 8).

Tabel 8: Clasele de risc AFP

Risc crescut de evoluție nefavorabilă	Fără diferențe corelate cu evoluția
AFP 1.1	AFP 1.0, AFP 0.1, AFP 0.0
Fgn \geq 500 mg/dL+PLT \geq 125	Fgn \geq 500 mg/dL +PLT<125 Fgn<500 mg/dL +PLT \geq 125 Fgn<500 mg/dL+PLT<125

S-a analizat potențialul cumulativ prognostic pentru ambele criterii evaluate împreună, utilizând analiza curbei ROC. Având în vedere că analiza ROC permite evaluarea unui singur parametru, am transformat valorile absolute ale fibrinogenului și PLR în valori procentuale față de nivelurile cut-off stabilite în analiza inițială, 500 mg/dL și 125, fapt care a permis trasarea curbei ținând cont de ambii parametri simultan. Rezultatele obținute sunt prezentate mai jos (Tabel 9.)

Tabel 9: Fibrinogen+PLR %: analiza ROC

	Fibrinogen+PLR
Aria de sub curbă (AUC)	0.739
Eroarea Standard	0.05183
Intervalul de confidență 95%	0.6374 to 0.8406
Valoarea p	<0.0001

Tabel 9: Semnificație statistică $p < 0.05$

Analiza ROC efectuată în funcție de valoarea cumulativă a celor doi factori arată o creștere a ariei de sub curbă AUC la 0.739 față de fiecare dintre cei doi parametri ai PEFP analizați individual (AUC=0.0702 pentru fibrinogen și AUC=0.666 pentru PLR). Astfel, luate împreună, cele două elemente permit dezvoltarea unui test substantial îmbunătățit de selecție a subiecților cu risc crescut de evoluție nefavorabilă.

BIBLIOGRAFIE

Chen, M.-F., Chen, P.-T., Kuan, F.-C., & Chen, W.-C. (2019). The Predictive Value of Pretreatment Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 26(1), 190–199. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6944-1>

De Souza Lucena, E. E., Costa, D. C. B., Da Silveira, E. J. D., & Lima, K. C. (2012). Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01910.x>

Hannah, R. M. and R. (2019). Cancer. <https://Ourworldindata.Org/Cancer>.

Kaugars, G. E., Pillion, T., Svirsky, J. A., Page, D. G., Burns, J. C., & Abbey, L. M. (1999). Actinic cheilitis a review of 152 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(99\)70115-0](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(99)70115-0)

Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R. L., Gooding, W., & Whiteside, T. L. (2005). Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. <https://doi.org/10.1159/000082506>

Laytragoon Lewin, N., Lewin, F., Andersson, B. Å., Löfgren, S., & Rutqvist, L. E. (2017). The use of rapid and cost-effective blood-based biomarkers in combination with tumour TNM stage for individual head and neck cancer patient treatment selection. *Medical Oncology*, 34(4), 3–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0912-7>

Lupu, M., Caruntu, A., Caruntu, C., Boda, D., Moraru, L., Voiculescu, V., & Bastian, A. (2018). Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Molecular and Clinical Oncology*, March. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1599>

Lupu, M., Popa, I., Voiculescu, V., Boda, D., Caruntu, C., Zurac, S., & Giurcaneanu, C. (2019). A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm8040449>

Näsman, A., Bersani, C., Lindquist, D., Du, J., Ramqvist, T., & Dalianis, T. (2017). Human papillomavirus and potentially relevant biomarkers in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 37(10), 5319–5328. <https://doi.org/10.21873/anticancer.111958>

Picascia, D. D., & Robinson, J. K. (1987). Actinic cheilitis: A review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. In *Journal of the American Academy of Dermatology*. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(87\)70201-1](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(87)70201-1)

Spector, M. E., Bellile, E., Amlani, L., Zarins, K., Smith, J., Brenner, J. C., Rozek, L., Nguyen, A., Thomas, D., McHugh, J. B., Taylor, J. M. G. G., & Wolf, G. T. (2019). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 1–8. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.2427>

Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>

Vieira, R. A. M. A. R., Minicucci, E. M., M.E.A., M., & S.A., M. (2012). Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: Clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia*.

**PROCEDEU DE EVALUARE A RISCULUI PROGNOSTIC IN
CANCERUL DIN SFERA ORO-MAXILO-FACIALA BAZAT PE
VALORILE SERICE ALE FIBRINOGENULUI SI RAPORTULUI
PLACHETE-LIMFOCITE**

Revendicari

1. Procedeu de evaluare a riscului prognostic in cancerul din sfera oro-maxilo-faciala, bazat pe valorile serice ale fibrinogenului si raportului plachete-limfocite, care include doi parametri biologici: fibrinogenul seric și raportul PLR .
2. Analiza ROC(Receiver operating characteristic-Caracteristica de functionare a receptorului) efectuată în funcție de valoarea cumulativă a celor doi factori(fibrinogen seric si raportul PLR), permit dezvoltarea unui test mai eficace de selecție a subiecților cu risc crescut de evoluție nefavorabilă.