

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DOMENIUL MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
DETERMINAREA FACTORILOR IMUNOLOGICI CU IMPACT
ASUPRA PROGNOSTICULUI ȘI REZISTENȚEI LA TRATAMENT ÎN
CANCERUL DE SÂN

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. ANGHEL RODICA-MARICELA

Doctorand:

ZGURA ANCA FLORINA

București

2018

PARTEA GENERALĂ

Cancerul de sân reprezintă 28,2% din toate cazurile de cancer la femei conform raportului GLOBOCAN, care a estimat că în 2018 au fost diagnosticate aproximativ 2.089 milioane de cazuri noi de cancer mamar la nivel global.

Cancerul de sân este una dintre cele mai studiate forme de cancer și înglobează tumori cu histologii, agresivitate, răspuns la tratament și evoluție diferite. Dezvoltarea tumorală este un proces heterogen, ceea ce face dificilă evaluarea relației dintre tumoră și micromediul tumoral.

Sistemul imun joacă un rol important în cancerul de sân. Dovezile faptului că cancerul de sân poate determina un răspuns imun sunt prezența celulelor imune infiltrative și a limfocitelor (TILs) în micromediul tumoral și instabilitatea genetică care conduce la creșterea numărului de mutații, traduse în mai multe neoantigene. Caracteristicile menționate mai sus sunt mai pronunțate în subtipul triplu negativ (TNBC) și cancerule de sân care supraexprimă factorul de creștere epidermal uman receptor 2 (HER-2), acestea fiind considerate subtipurile cele mai imunogene.

Teza de doctorat este redactată pe două părți: partea generală care cuprinde patru capitole cu informații actuale din literatura internațională și partea specială alcătuită din capitolele de cercetare, concluzii și bibliografie.

Partea generală prezintă în detaliu stadiul actual al cunoașterii cancerului de sân, prezentarea factorilor de prognostic cunoscuți, încadrarea carcinoamelor în subtiparea moleculară cu accent pe cancerule de sân care supraexprimă HER2 și triplu-negativ.

În ultimul capitol din partea generală intitulat „Cancerul de sân și sistemul imun” este prezentat rolul sistemului imun în progresia, predicția și răspunsul la tratament în cancerul de sân.

PARTE SPECIALĂ

Obiectivele studiului doctoral au inclus

1. selectarea pacientelor luate în studiu pe baza criteriilor de includere;
2. stabilirea parametrilor clinico-morfologici și a markerilor moleculari și imunologici utilizați în investigație;

3. includerea pacientilor și a parametrilor urmăriți într-o bază de date în vederea efectuării analizelor statistice;
4. analiza histopatologică a tumorilor și a ganglionilor axilari și analiza imunohistochimică (HER2/neu, ER, PR, Ki67) a tumorilor;
5. analiza modificărilor diferitelor subseturi de limfocite T(CD3+, CD4+, CD8+ și raportul dintre acestea) în relație cu răspunsul la terapia specifică carcinomului mamar și asocierea lor cu infiltratul limfocitar tumoral pre-tratament.
6. stabilirea unor corelații între parametrii clinici, histopatologici, imunologici și imunohistochimici studiați și cuantificarea valorii prognostice și predictive a acestora;
7. stabilirea corelației dintre parametrii imunologici și dezvoltarea tumorală, ca posibili factori de prognostic în raport cu factorii prognostici cunoscuți (numărul ganglionilor invadați tumoral, gradul de diferențiere tumorală, mărimea tumorii, KI67, prezența sau absența receptorilor hormonalilor, prezența sau absența HER2), intervalul liber de boală, supraviețuirea generală și răspunsul la tratament.

Materiale si metode

Studiul a fost realizat pe un număr de 56 de paciente diagnosticate și internate în Secția Radioterapie II, în Institutul Oncologic “Prof. Alexandru Trestioreanu”, București în perioada 2012-2018.

Cele 56 paciente înrolate în studiu au fost împărțite în două loturi în funcție de prezența sau absența HER 2/neu. Pacientele au fost informate cu privire la scopul și desfășurarea studiului și au semnat consimțământul informat.

Pentru loturile studiate am realizat într-o primă etapă descrierea infiltratului inflamator pe lamele standard colorate cu hematoxilin eosina (HE) sau prin analiza imunohistochimică.

Criterii de includere

- Diagnostic de cancer mamar confirmat histopatologic, indiferent de staging, grading
- piesele histologice au întrunit condiții tehnice optime pentru procesarea extinsă imunohistochimică
- prezența descrierii TILs în rezultatul anatomo-patologic (procente, tipuri)
- Stadiu TNM: I-IV

- Vârsta > 20 ani
- Indicele de performanță (ECOG) < 3
- Valori ale probelor hematologice : Hemoglobina (Hb) > 8,5g/dl, număr de leucocite (WBC) > 2500 /ul, număr de neutrofile (NEU) > 1500/ul, număr trombocite > 100000/ul
- Consimțământ informat semnat de către pacient
- Durata speranței de viață estimată mai mult de 2 luni
- A fost permisă includerea în studiu a pacienților care au urmat atât tratament adjuvant cât și neoadjuvant, radioterapie sau orice alt tratament pentru boală metastatică.

Criterii de excludere

- Refuzul participării la studiu (consimțământ informat)
- Status de performanță (ECOG) \geq 3
- Probe de laborator care contraindică chimioterapia
- Femei aflate în perioada de lăuzie
- Femei care prezintă test de sarcină pozitiv
- Femei diagnosticate cu boli autoimune
- Femei diagnosticate cu boli hematologice
- Infecții recurente

Metode utilizate

Pentru **analiza histopatologică**, toate blocurile tumorale au fost fixate în formalină 10% și s-au încorporat în parafină preparându-se secțiuni groase pentru colorarea cu hematoxilină-eozină și testare imunohistochimică (IHC)

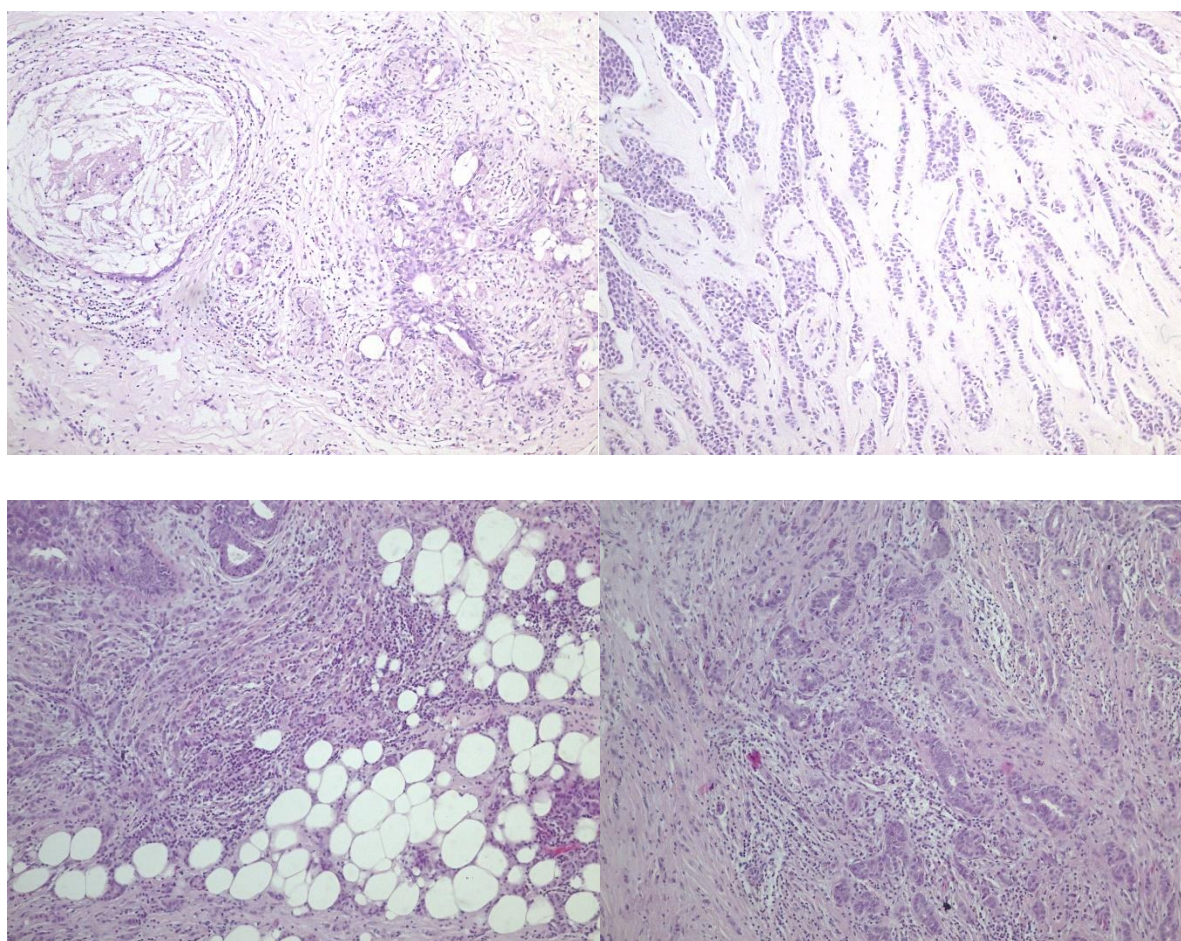
Imunohistochimia (IHC)

Imunohistochimia este o metodă histologică de identificare a constituenților celulari sau tisulari prin exploatarea principiului legării anticorpilor la antigene. Vizualizarea epitopilor se realizează prin aplicarea unui substrat cromogen (tipic diaminobenzidină - DAB).

Gradarea infiltratului:

Numarul TILs (tumor infiltrating lymphocytes) a fost estimat prin analiza infiltratului inflamator mononuclear în regiunile stromale ale tumorilor analizate utilizând obiective 20x – 40 x. Niveul infiltratului a fost calculat prin raportarea ariei ocupate de TILs la aria totală a stromei tumorale și rezultatele au fost impartite în 3 categorii:

- infiltrat inflamator redus (0-10% din stromă)
- infiltrat inflamator moderat(10-40% din stromă)
- infiltrat inflamator bogat(40-90% din stromă)

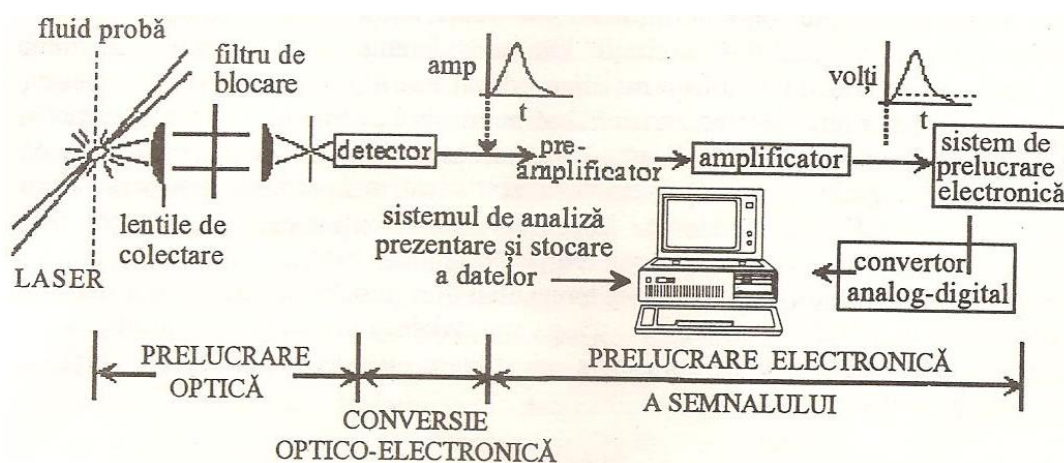


Evaluarea histopatologică a infiltratului limfocitar tumoral (Arhiva Prof. Dr. Ardeleanu Carmen)

A doua etapă a constat în analiza prin tehnica citometriei de flux a modificărilor diferitelor subseturi de limfocite în relație cu răspunsul la terapia specifică carcinomului mamar la un număr de 50 de paciente.

Principiul metodei

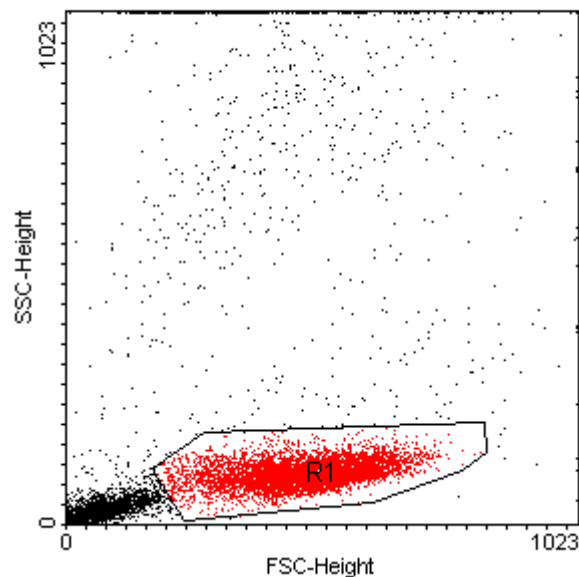
Citometria în flux reprezintă o tehnică ce permite măsurarea proprietăților unor particule biologice aflate în suspensie rulând printr-un sistem în flux. Termenul s-a format din alți trei termeni de bază (cito = celulă, metrie = măsurare, flux, referindu-se la fluxul de particule în suspensie) iar suspensia reprezintă starea în care particulele se găsesc dispersate într-un fluid. Probele marcate sunt achiziționate la citometrul în flux. În timpul achiziției probei, celulele se deplasează una câte una prin dreptul unui fascicul laser dispersând lumina incidentă (fenomen numit dispersie luminoasă). În același timp celulele marcate cu fluorocrom emit fluorescență generată de fixarea reagenților marcați. Aceste semnale de dispersie și de fluorescență, detectate de instrument, furnizează informații atât despre dimensiunea celulei (FSC), complexitatea internă a acesteia (SSC) cât și despre intensitatea fluorescenței relative. Pot fi descrise trei etape distincte de prelucrare a luminii dispersate și a fluorescenței emise de către particula analizată. În prima etapă (de prelucrare optică) lumina provenită de la celule este colectată prin intermediul unor dispozitive optice, fiind apoi selectate prin filtrare anumite lungimi de undă ce sunt dirijate către detectori. În a doua etapă (conversia optico-electronică), la nivelul detectorilor se generează un semnal electric proporțional cu intensitatea semnalului optic captat. În etapa a treia (de prelucrare electronică a semnalului) impulsurile de natură electrică produse de detectori sunt amplificate. Semnalele de natura electrică sunt apoi convertite în valori digitale ce pot fi prelucrate, stocate și afișate de computerul atașat sistemului. Celulele apar grafic ca aglomerări de puncte alcătuind populații celulare distincte (limfocite, limfocite T, limfocite Th, limfocite Ts/c), iar aparatul înregistrează valorile sub formă de procente de seturi și subseturi din populațiile celulare testate.



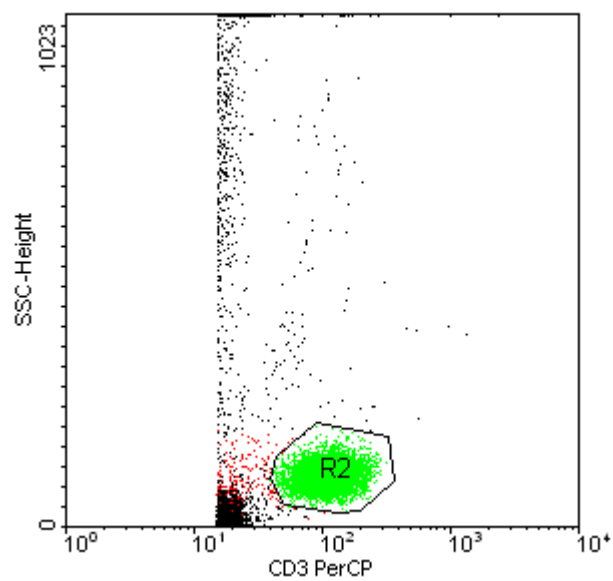
Principiul de funcționare al citometrului în flux, incluzând prelucrarea semnalelor în cadrul componentelor principale ale sistemului

Folosind metoda de imunofluorescență directă (tripla marcare directă cu anticorpi monoclonali fluorocromati) markerii antigenici ai limfocitelor T totale, T helper și T supresoare/citolitice au fost cuantificați cu ajutorul kitului TriTEST CD4FITC/CD8PE/CD3PerCP (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA. Kitul conține următorii anticorpi monoclonali marcați fluorescent: Ac anti CD3-Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Ac anti CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC) și Ac anti CD8-phycoerythrin (PE). Sângele periferic (cca 2 ml) a fost recoltat pe K3 EDTA. 20 μ l anticorpi monoclonali marcați fluorescent (din kitul BD Tritest™) se incubează în condiții de întuneric, la temperatura camerei, cu 50 μ l sânge periferic recoltat pe K3 EDTA. După 15 min de la incubare se adaugă 450 μ l soluție de liza (BD FACS™ Lysing solution, 1x). După 15 min de la incubarea cu soluția de liză probele se citesc cu ajutorul citometrului în flux BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) echipat cu laser 488-nm, cu emisie detectabilă în domeniile: 515–545 nm (FITC), 562–607 nm (PE), >650 nm (PerCP). Achiziția probelor (10.000 evenimente) și analiza rezultatelor se efectuează în programul BD CellQuest (BD Biosciences), în coordonate FSC vs SSC, CD3-PerCP vs SSC și CD4-FITC vs CD8-PE.

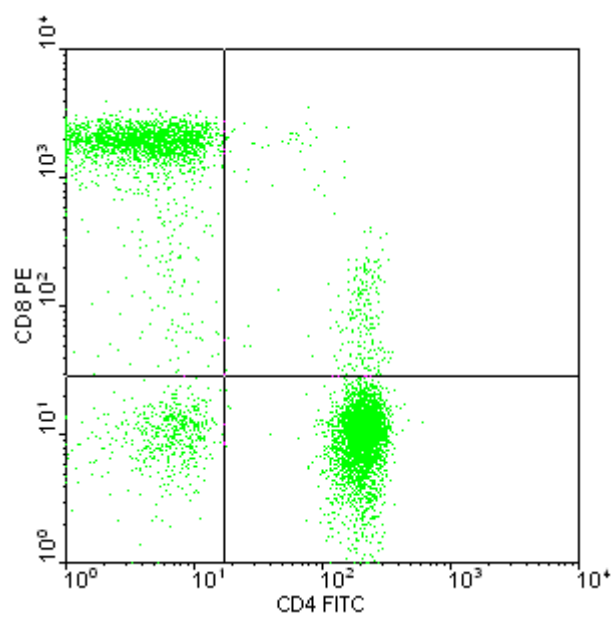
Rezultatele sunt prezentate grafic sub forma de imagini punct cu punct (“dot plot”), fiecare punct reprezentând un eveniment/celulă:



FSC (dimensiunea celulelor; FSC=forward scatter) vs SSC (granularitatea/complexitatea celulelor; SSC=side scatter); “R1” = populația de limfocite;



CD3-PerCP (intensitatea fluorescenței asociată anticorpului anti CD3) vs SSC; “R2” include populația T limfocitară (CD3+);



CD4-FITC (intensitatea fluorescenței asociată anticorpului anti CD4) vs CD8-PE (intensitatea fluorescenței asociată anticorpului anti CD8).

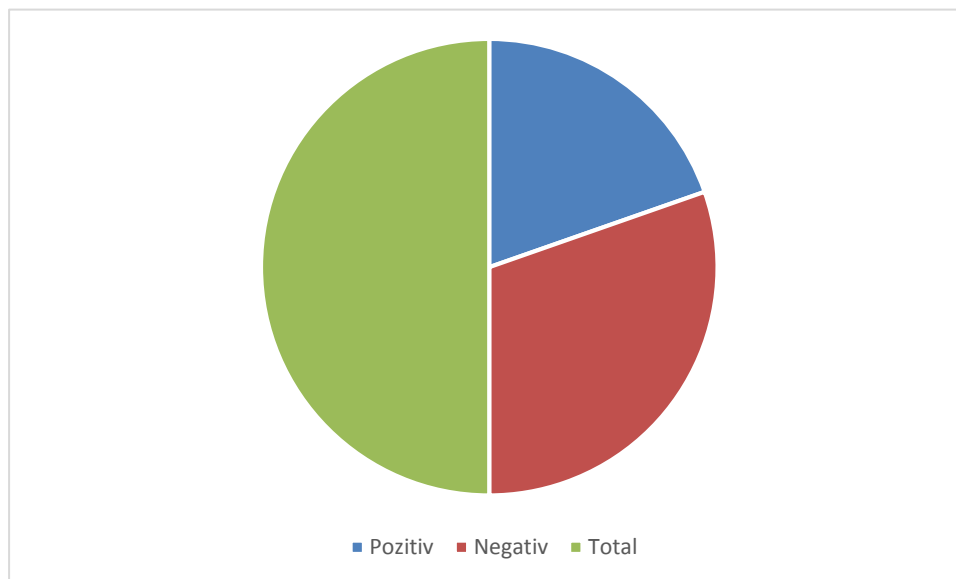
REZULTATE ȘI DISCUȚII

În prima etapă am efectuat descrierea loturilor stabilite și am corelat statistic variabilele luate în calcul în vederea evaluării infiltratului limfocitar tumoral apreciind rolul său în dezvoltarea tumorală ca și posibil factor de prognostic.

HER					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Pozitiv	22	39.3	39.3	39.3
	Negativ	34	60.7	60.7	100.0
	Total	56	100.0	100.0	

Distribuția pacienților în funcție de HER-2/neu

Din totalul de 56 de paciente incluse în studiu, 22 de paciente au fost HER-2/neu pozitive (39,3%), restul de 34 de paciente HER-2/neu negative (60,7%).



Reprezentarea grafica a pacientelor în funcție de HER-2/neu.

Din reprezentarea grafică se observa că pacientele HER-2/neu neg predomină.

Din studiul de față rezultă faptul că vârsta medie a pacientelor la momentul diagnosticării a fost de 54,23 de ani , (minima de 29 de ani si maxima de 82 de ani). Pentru pacientele HER2 negativ varsta medie a fost de 50,74 ani, iar pentru cele HER2 pozitiv a fost de 59,64 ani. Exista corelatie semnificativa statistic intre expresia HER2/neu și vârsta mai ridcată la momentul diagnosticării.

Perioada medie de urmărire a pacientelor a fost de de 32,14 luni de la momentul diagnosticării.

Corelatii statistice între ER și PR

		ER		Total
		pozitiv	negativ	
PR	Count	20	3	23
	% within PR	87.0%	13.0%	100.0%
	Count	2	9	11
	% within PR	18.2%	81.8%	100.0%
Total	Count	22	12	34
	% within PR	64.7%	35.3%	100.0%

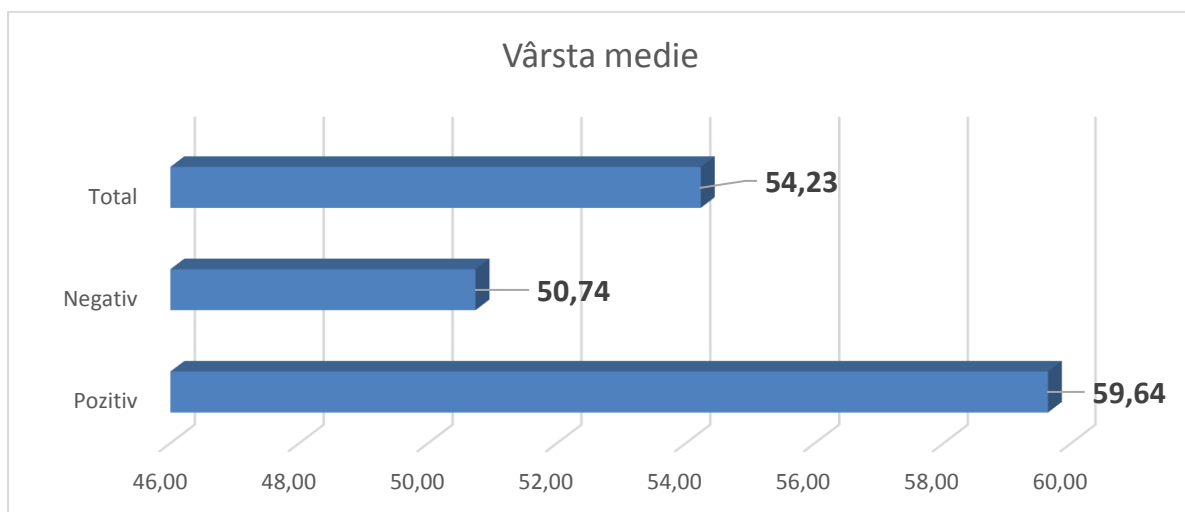
Corelație statistică între ER și PR

Pacientele din lotul HER2/neu negativ au fost împartite în două subloturi în funcție de absența sau prezența receptorilor hormoni astfel: 9 paciente au prezentat receptori de estrogen(ER) si progesteron (PR)negativi și 25 de paciente receptori de estrogeni pozitivi, indiferent de statusul PR.

Pacientele cu vârstă de 35 de ani sau mai tinere în momentul diagnosticării au o rată a supraviețuirii mai redusă la 5 ani (74,7% față de 83,8% până la 88,3% pentru femeile cu vârsta cuprinsă între 35 și 69 ani), chiar dacă au primit tratament în funcție de stadiul bolii ceea ce indică agresivitatea bolii în cazul pacientelor tinere. Femeile peste vârsta de 65 de ani în momentul diagnosticării au o mortalitate crescută datorita comorbiditatiilor asociate, prezentării la medic în stadii avansate ale bolii, și terapiilor mai puțin agresive.

Din studiul de față rezultă faptul că vârsta medie a pacientelor la momentul diagnosticării a fost de 54,23 de ani , (minima de 29 de ani si maxima de 82 de ani). Pentru pacientele HER2 negativ varsta medie a fost de 50,74 ani, iar pentru cele HER2 pozitiv a fost de 59,64 ani. Exista corelatie semnificativa statistic intrre expresia HER2/neu si vârsta mai ridcată la momentul diagnosticării.

Perioada medie de urmărire a pacientelor a fost de de 32,14 luni de la momentul diagnosticării.



Reprezentarea grafică a vârstei medii la momentul diagnosticării

Din reprezentarea grafică reiese faptul că pacientele cu Her2 pozitiv au avut vârstă medie de 59,64 ani față de pacientele Her2 negativ care au avut vârsta de 50,74 ani.

Corelație statistică a pacienților HER2+/- în funcție de vârstă

Statistică descriptivă ^a					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
luni_de_la_diagnostic	22	2	54	27.18	17.840
varsta	22	31	82	59.64	15.268
Valid N (listwise)	22				
a. HER = Pozitiv					

Distribuția pacienților HER-2/neu pozitiv în funcție de vârstă

Statistică descriptivă ^a					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
luni_de_la_diagnostic	34	3	344	35.35	59.128
Varsta	34	29	77	50.74	13.090
Valid N (listwise)	34				
a. HER = Negativ					

Distribuția pacienților cu HER-2/neu negativ în funcție de vârstă

Pentru pacientele HER-2/neu pozitiv vârsta mediană a fost de 59,64 de ani. În cazul pacienților HER-2/neu negativ vârsta medie la momentul diagnosticării a fost de 50,74 ani.

Independent Samples Test								
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-	Mean Differen	Std. Error	95% Confidence
		.			(2-			

						taile d)	ce	Differen ce	Interval of the Difference	
									Lower	Uppe r
varst a	Equal varianc es assume d	1.029	.31 5	2.32 7	54	.024	8.901	3.824	1.234	16.56 9
	Equal varianc es not assume d			2.25 1	39.97 3	.030	8.901	3.954	.909	16.89 3

- $0,024 < 0,05 \Rightarrow$ respingere

Corelație statistică între HER-2/neu și vârstă

Valoarea mica a testului de corelație (0,0024) demonstrează existenta unei corelații între vârsta mai ridicată a paciențelor și pozitivitatea pentru HER2.

Pacientele HER2/neu pozitiv au o vârstă mai ridicată la momentul diagnosticării față de pacientele cu HER2/neu negativ.

			varsta	HER
Kendall's tau_b	Varstă	Correlation Coefficient	1.000	-.249*
		Sig. (2-tailed)		.026
		N	56	56
	HER	Correlation Coefficient	-.249*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.026	
		N	56	56
Spearman's rho	Varstă	Correlation Coefficient	1.000	-.300*
		Sig. (2-tailed)		.025

		N	56	56
	HER	Correlation Coefficient	-.300*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.025	
		N	56	56

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Corelație statistică între HER-2/neu negativ și vârstă

Pacientele cu HER-2/neu negativ au o vârstă mai mică în momentul diagnosticării , coeficientul de corelație fiind de 0,249($0,026 < 0,05$).

Corelație statistică între HER2+/- și TILs

			TILs1			Total
			reduc	moderat	bogat	
HER	Pozitiv	Count	11	8	3	22
		% within HER	50.0%	36.4%	13.6%	100.0%
	Negativ	Count	15	13	6	34
		% within HER	44.1%	38.2%	17.6%	100.0%
Total		Count	26	21	9	56
		% within HER	46.4%	37.5%	16.1%	100.0%

Corelație statistică între HER-2/neu și TILs

Din analiza infiltratului inflamator tumoral(TILs) în raport cu statusul HER-2/neu am observat că din totalul de 22 de paciente cu HER-2/neu +, 11 paciente au prezentat TILs redus, 8 moderat și 3 paciente TILs bogat, iar în grupul format din 34 de paciente cu HER-2/neu negativ, 14 au prezentat TILs redus, 13 moderat și 6 paciente TILs bogat.

Din punct de vedere statistic nu există o corelație între HER-2/neu și TILs.

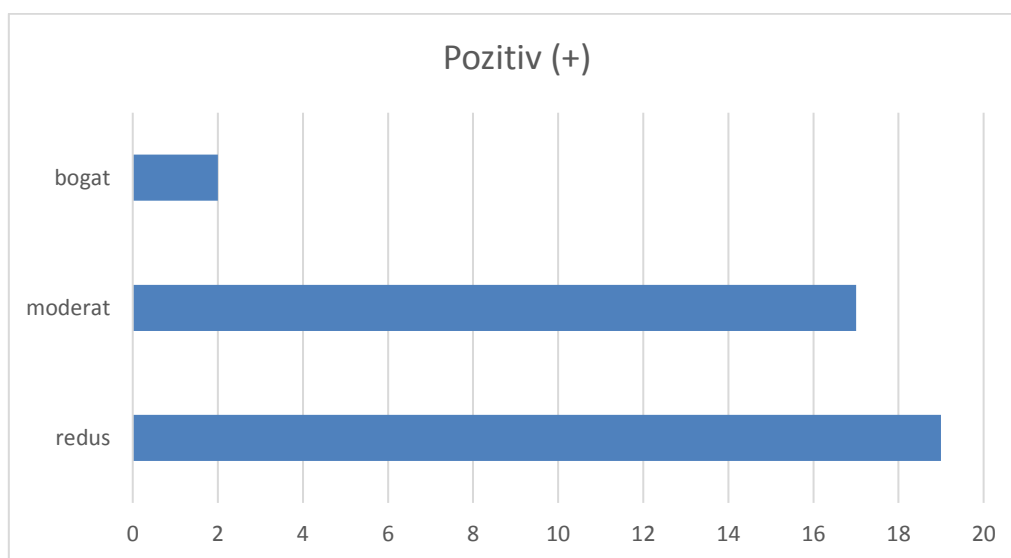
Corelație statistică între TILs și ganglioni limfatici +/-

nodes * TILS1 Crosstabulation						
			TILS1			Total
			reduc	moderat	Bogat	
nodes	+	Count	19	17	2	38
		% within nodes	50.0%	44.7%	5.3%	100.0%
	-	Count	7	4	7	18
		% within nodes	38.9%	22.2%	38.9%	100.0%
Total		Count	26	21	9	56
		% within nodes	46.4%	37.5%	16.1%	100.0%

Corelație statistică între TILs și ganglioni limfatici

Dintre pacientele cu ganglioni axilari pozitivi, 19 paciente au prezentat TILs redus, 17 moderat și 2 paciente TILs în cantitate crescută.

Se observa că prezența ganglioni axilari pozitivi se asociază cu TILs în cantitate redusă sau moderată, iar prezența ganglionilor axilari negativi este mai frecventă în grupele de paciente cu TILs bogat și redus.



Reprezentare grafică TILs în funcție de ganglioni axilari pozitivi

Se observa că prezența ganglioni axilari pozitivi se asociază cu TILs în cantitate redusă sau moderată, fapt confirmat de Ismail Jatoi et all in1999, care a concluzionat că prezența metastazelor ganglionare nu sunt numai un marker de diagnostic cât și un marker al prezenței unui fenotip agresiv.

Corelație statistică între Gradul histologic și TILs

Grade * TILS1 Crosstabulation						
			TILS1			Total
			reduc	moderat	bogat	
Grade	1	Count	1	1	0	2
		% within Grade	50.0%	50.0%	0.0%	100.0%
	2	Count	12	13	4	29
		% within Grade	41.4%	44.8%	13.8%	100.0%
	3	Count	13	7	5	25
		% within Grade	52.0%	28.0%	20.0%	100.0%
Total		Count	26	21	9	56
		% within Grade	46.4%	37.5%	16.1%	100.0%

Corelație statistică între Gradul histologic și TILS

Analiza TILs în raport cu gradul de diferențiere tumorală a concluzionat faptul că tumorile cu TILs în cantitate redusă se asociază cu un grad de diferențiere scăzut(G3).

Indicele de proliferare Ki 67 este unul dintre factorii de prognostic importanți în cancerul de sân, independent de statusul ganglionilor axilari. Rolul său ca factor predictiv în stabilirea tratamentului neoadjuvant și adjuvant este controversat datorită rezultatelor conflictuale obținute în diferite studii.

Valoarea medie a indicelui de proliferare Ki67 a fost în lotul nostru de 27,86%. În cazul pacientelor Her-2/neu negativ valoarea medie a fost de 31,26% și pentru cele cu Her-2/neu pozitiv 22,59% (asociere semnificativă statistic).

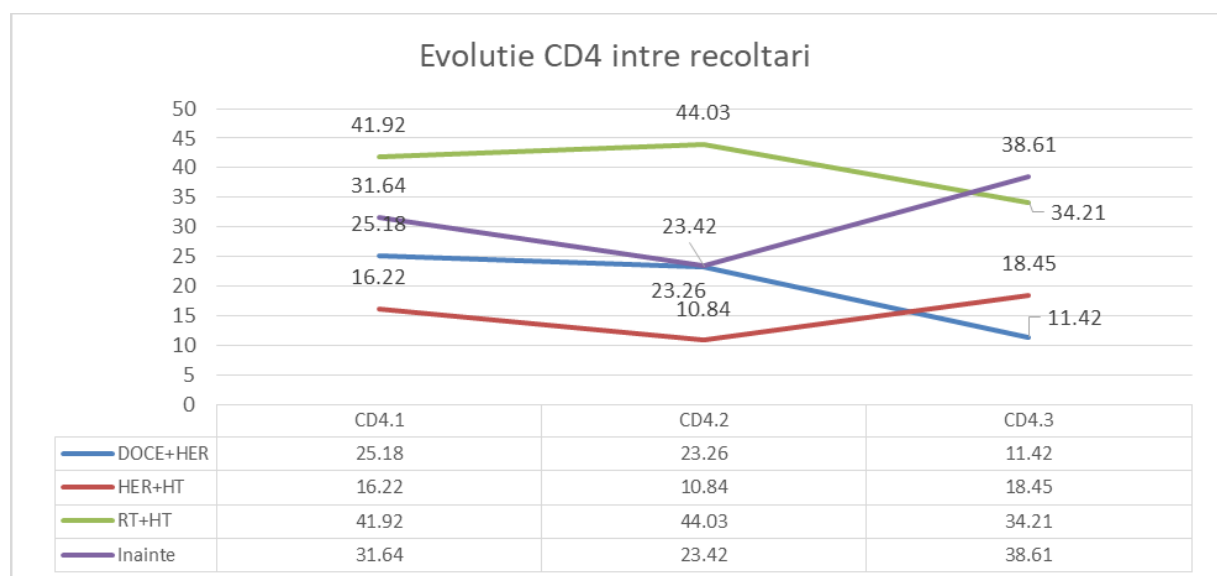
Prezența TILs în cantitate redusă se corelează cu valoarea indicelui de proliferare Ki67 mai mare, așa cum se evidențiază și în studiul efectuat de Maria Vittoria Dieci et al., 2015. Prezența TIL se corelează cu o supresie mai mare a Ki67 după terapia endocrină neoadjuvantă, dar pare să prevină un răspuns molecular după chimioterapie pentru HER2 + / HER2-.

Analiza relației dintre densitatea TILs și vârsta pacientului a demonstrat faptul că limfocitele T și subgrupurile acestora CD4 + și CD8 + au fost asociate direct cu vârsta pacientului. O astfel de relație a fost investigată în câteva studii cu rezultate discordante efectuate Marsigliante și colab. care a constatat că numai celulele T au fost asociate direct cu vârsta pacientului, sprijinind astfel, în parte, rezultatele noastre. În schimb, Menard și colab. nu au raportat diferențe semnificative între diferitele grupe de vârstă în ceea ce privește frecvența TILs. Mai recent, Mahmoud și colab. au arătat că numărul de limfocite CD8 + a fost slab invers proporțional cu vârsta pacientelor cu cancer mamar.

Din analiza valorilor raportului CD4/CD8 în cazul pacientelor cu metastaze am observat faptul că valoarea crescută a raportului s-a asociat cu un număr redus de metastaze și faptul că pacientele varstnice au o valoare a raportului crescută față de pacientele tinere.

Raportul CD4/CD8 este crescut în grupul pacientelor cu TILs redus și scăzut în grupul pacientelor cu TILs bogat.

Modificările subpopulațiilor limfocitare pe parcursul tratamentului



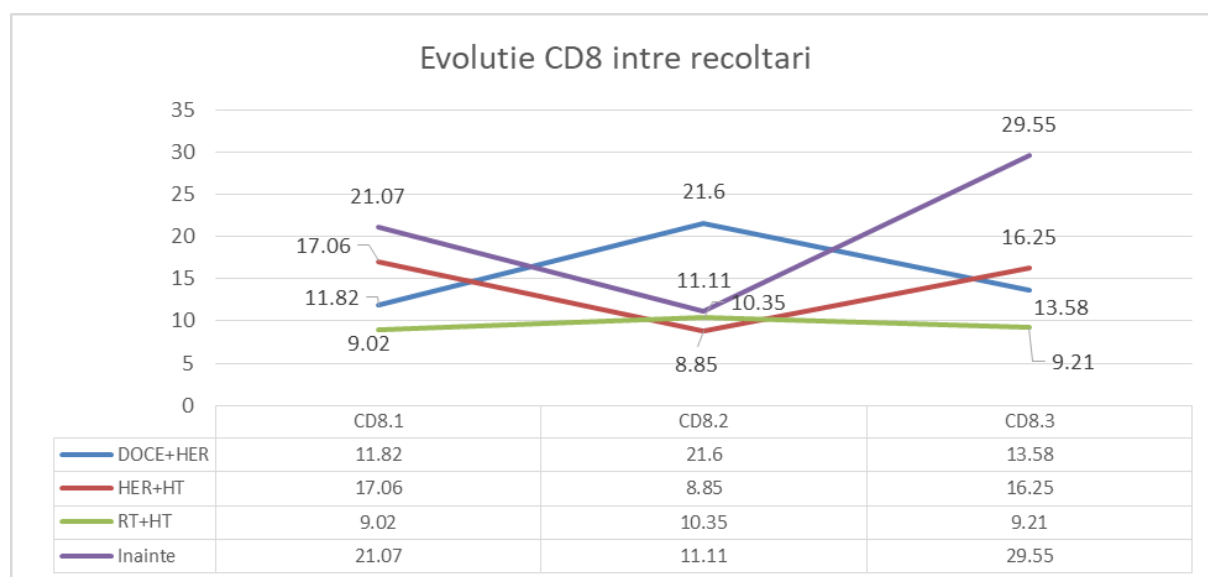
Evoluția CD4+T în funcție de tratament

În cazul pacientei aflate în curs de radioterapie se observă o creștere a valorilor limfocitelor T CD4+, urmată de o descreștere la o luna post radioterapie.

În cazul pacientei aflate în curs de tratament cu Transtuzumab și tratament hormonal se observă inițial o descreștere urmată de o creștere a valorilor T CD4+.

Pacienta aflată în curs de tratament cu Docetaxel și Transtuzumab inițial s-a menținut o fază de platou între cele 2 evaluări urmată de o descreștere la ultima evaluare.

Pentru pacienta care a primit tratament neoadjuvant se observa o descreștere la evaluarea după prima serie de chimioterapie urmată de o creștere a valorilor după a doua serie.



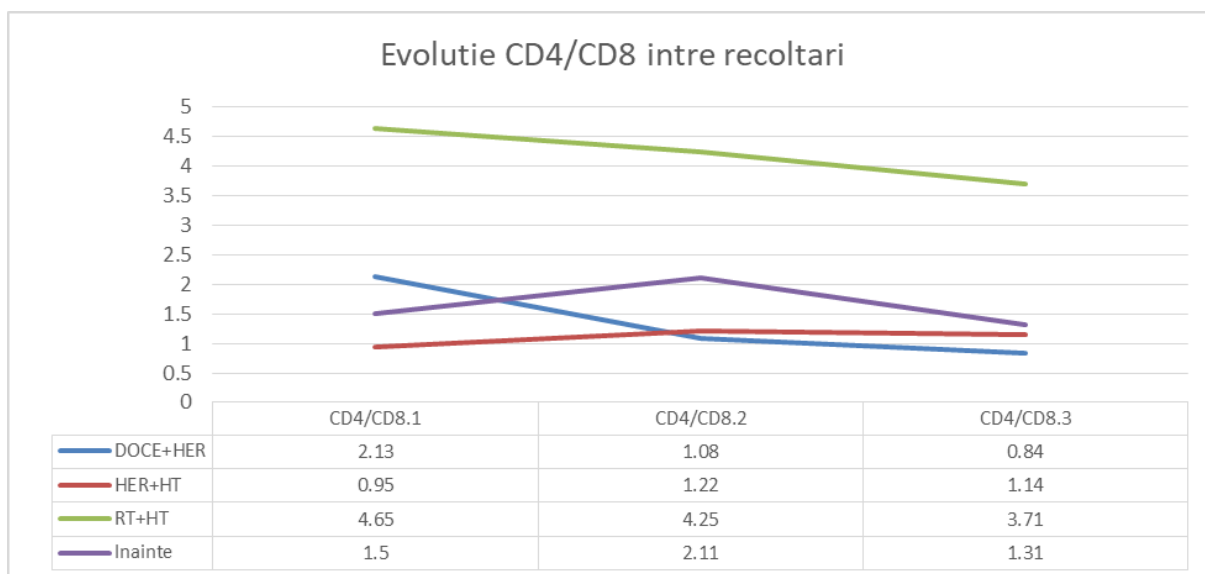
Evolutia CD8+T în funcție de tratament

În cazul pacientei aflate în curs de radioterapie se observă menținerea unor valori similare ale limfocitelor T CD8+ .

În cazul pacientei aflate în curs de tratament cu Transtuzumab și tratament hormonal se observă inițial o descreștere (8,85%) urmată de o creștere a valorilor (16,25%) .

Pacienta aflată în curs de tratament cu Docetaxel și Transtuzumab inițial se observa o creștere a valorilor (21,6%), urmată de o descreștere(13,58%).

În cazul pacientei care a primit tratament neoadjuvant se observă o descreștere după prima serie (11,11%) urmată de o creștere după a doua serie (29,22%) de tratament.



Evoluția raportului în funcție de tratament în dinamică

Pentru pacienta aflată în curs de tratament cu Docetaxel și Transtuzumab se observă o scădere a raportului între evaluări, de la 2.13 la prima evaluare, 1,08 la a doua și 0,84 la ultima evaluare.

Pentru pacienta aflată în curs de tratament cu Transtuzumab și hormonoterapie se observă o creșterea a raportului la a doua evaluare (1.22) urmată de o ușoară scădere(1.14).

Pentru pacienta aflată în curs de radioterapie se observă o scădere a raportului la evaluările efectuate în perioada de tratament cat, scăderea se mentine si la o lună dupa terminarea sedintelor de radioterapie (3.71).

Pentru ultima pacienta, prima evaluare s-a efectuat înainte de initierea chimioterapiei, valoarea raportului fiind de 1.5, crescând dupa prima sedință la 2.11, ulterior scăzând la 1.31 dupa a doua sedință de tratament.

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CD3 (%)	34	50.95	24.18	75.13	53.5079	11.09944
CD4 (%)	34	28.95	13.35	42.30	28.1724	6.97379
CD8 (%)	34	23.97	8.08	32.05	20.6638	6.63040
CD4/CD8	34	2.236793	0.709654	2.946447	1.494621	0.562676
Valid N (listwise)	34					

Valoarea medie a limfocitelor T pentru pacientele aflate în curs de tratament hormonal

Din totalul pacientelor 34 sunt în curs de tratament hormonal, iar valorile medii pentru CD4+T au fost 28,17%, pentru CD8+T a fost 20,66%, iar valoarea raportului a fost 1,49.

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CD3 (%)	6	12.97	47.39	60.36	52.3383	4.35802
CD4 (%)	6	19.46	22.46	41.92	31.5567	8.26869
CD8 (%)	6	20.19	8.58	28.77	17.0617	8.58743
CD4/CD8	6	3.785372	0.909267	4.694639	2.515384	1.772185
Valid N (listwise)	6					

Valoarea medie a limfocitelor T pentru pacientele în curs de radioterapie

În grupul pacientelor aflate în curs de radioterapie, valorile medii pentru CD4+T au fost de 31,55%, pentru CD8+T a fost 17,06% și valoarea raportului CD4/CD8 a fost de 2,5.

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CD3 (%)	9	32.97	22.99	55.96	43.9856	11.24280
CD4 (%)	9	20.26	10.84	31.10	23.7844	7.46628
CD8 (%)	9	15.67	8.85	24.52	16.7333	5.19339
CD4/CD8	9	1.721059	0.950762	2.671821	1.480460	0.521595
Valid N (listwise)	9					

Valoarea medie a limfocitelor T pentru pacientele în curs de tratament cu Transtuzumab

Pentru pacientele aflate în curs de tratament cu CHT+Transtuzumab valoarea medie ale CD4+T a fost de 23,78, pentru limfocitele T CD8+ de 16,73 și valoarea raportului 1,48.

Group Statistics					
RT/HT		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD4 (%)	3	6	31.5567	8.26869	3.37568
	9	34	28.1724	6.97379	1.19599
CD8 (%)	3	6	17.0617	8.58743	3.50580
	9	34	20.6638	6.63040	1.13710
CD4/CD8	3	6	2.5154	1.77218	0.72349
	9	34	1.4946	0.56268	0.09650

Corelație statistică a valorilor limfocitelor T în cazul pacienților în curs de tratament hormonal și radioterapie

Din punct de vedere statistic între grupul pacienților în curs de tratament hormonal și în curs de radioterapie nu există diferență statistică între valorile CD4+T și CD8+T.

Există diferență semnificativă statistic în cazul raportului CD4/CD8. Raportul CD4/CD8 este crescut în grupul pacienților în curs de radioterapie, fiind necesar un studiu suplimentar pe un lot mai mare de pacienți.

TRAT		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
CD4 (%)	2	9	23.7844	7.46628	2.48876
	3	6	31.5567	8.26869	3.37568
CD8 (%)	2	9	16.7333	5.19339	1.73113
	3	6	17.0617	8.58743	3.50580
CD4/CD8	2	9	1.48046	0.52160	0.17387
	3	6	2.51538	1.77218	0.72349

Valoarea medie a limfocitelor T pentru pacientele în curs de tratament cu Transtuzumab+HT și RT

Pentru pacientele aflate în curs de tratament cu Transtuzumab și hormonoterapie valoarea medie pentru limfocitele T CD4+ a fost de 23,78, pentru CD8+ 16,73, iar valoarea raportului 1,48.

Studiile recente au arătat că efectul terapeutic al trastuzumabului depinde de mecanismele dobândite și adaptive, mediate de imunitate. De exemplu, o terapie combinată care inhibă calea PI3K / AKT în cazul rezistenței la trastuzumab crește infiltrarea

intratumorală a celulelor T, măbind astfel efectul antitumoral și răspunsul imun mediat de celulă T CD8 + îmbunătățind astfel efectele terapeutice ale anticorpului anti-HER2. În cancerul de sân HER2 +, creșterea TIL este, de asemenea, asociată cu scăderea determinărilor secundare la pacienții care au primit, de asemenea, trastuzumab asociat chimioterapiei.

Pentru pacientele aflate în curs de radioterapie valoarea medie pentru limfocitele T CD4+ a fost de 31,55, pentru CD8+ 17,06, iar valoarea raportului CD4+/CD8+ 2,51.

RT poate distruge TIL-urile din stroma tumorii, ducând la epuizarea temporară a tuturor celulelor imune, de la CTL și NK, dar și Tregs conform Vatner et al. 2014. Celulele canceroase supraviețuitoare la RT suferă un mecanism de "modulare imunogenică", făcându-le mai sensibile la uciderea mediată imun .

Concluzii

Modularea sistemului imunitar este o strategie promițătoare de tratament în cancerul de sân, în special în subtipul triplu negativ și pentru tumorile cu supraexpresia HER2, acestea fiind și cele mai imunogene subtipuri.

TILs este unul dintre cele mai bune exemple ale relației stricte care există între apărarea naturală și carcinogeneza. În acest scenariu, evaluarea TILs ca factor prognostic și predictiv pentru chimioterapia neoadjuvantă ar trebui să devină o analiză efectuată în mod obișnuit, în special în ceea ce privește cele mai agresive subtipuri ale cancerului de sân, cum ar fi subvariantele moleculare triple-negativ și HER2 pozitiv.

Aceasta lucrare demonstrează că prezența TILs în cantitate redusă se asociază cu ganglioni axilari pozitivi și valoarea indicelui de proliferare Ki67 crescută.

În acest studiu, am studiat efectul TILs asupra rezultatelor clinice pe un lot de paciente cu cancer de sân HER2- și HER2 + tratați cu trastuzumab. **Aceste rezultate sugerează că trastuzumab este mai eficient în tratarea tumorilor cu TILs redus. Prin urmare, evaluarea TILs la diagnosticul inițial ar putea fi necesară pentru subdivizarea pacienților cu cancer de sân HER2 +, care ar beneficia mai mult de utilizarea suplimentară a trastuzumabului.** Dezvoltarea strategiilor care pot facilita un răspuns imun eficient este, de asemenea, justificată.

Din analiza limfocitelor T în dinamica în grupul pacientelor care au efectuat radioterapie putem observa o scădere a limfocitelor T pe parcursul tratamentului fiind necesare tehnici de radio-imunoterapie combinată pentru obținerea unui răspuns imun mai bun.

Ne propunem continuarea prezentului studiu prin evaluarea limfocitelor T în funcție de numărul de fracții și în cazul iradierii ganglionilor limfatici sau a maduvei osoase.

Limfocitele T CD4 + și CD8 + au roluri opuse în progresia cancerului de sân și în urmărirea. Din analiza celulelor T CD 4+ în raport cu prezenta metastazelor s-a evidențiat faptul că valorile crescute ale CD4+ se asociază cu un număr redus de metastaze.

Bibliografie

- GLOBOCAN. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018; http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, accesat în data de 07.10.2018
- National Comprehensive Cancer Network Guidelines Version 3.2017, Rectal cancer, https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast-screening.pdf
- E. Senkus, S. Kyriakides, S. Ohno, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, E. Rutgers, S. Zackrisson & F. Cardoso, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice. Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up; *Annals of Oncology* 26 (Supplement 5): v8–v30, 2015; http://annonc.oxfordjournals.org/content/26/suppl_5/v8.full.pdf+html;
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, et al.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986 320:1349.
- Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J: Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res* 1992, 12:1463-1466.
- Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjanen K: Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 1992, 28A:859-864.
- Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, et al.: A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003, 349: 546-553.
- Page DL, Jensen RA, Simpson JF: Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 51:195-208.
- Badwe RA, Thorat MA, Parmar VV: Sentinel-node biopsy in breast cancer. *N Engl J Med* 2003, 349:1968-1971; author reply 1968-1971.
- Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP: Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med* 2005, 2: e284.