

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



***Studiul factorilor de malignitate și prognostic în tumorile
stromale gastro-intestinale***
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MARIA SAJIN**

**Student-doctorand:
ROȘULESCU ALEXANDRA**

2022

CUPRINSUL TEZEI

LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	v
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI.....	vi
INTRODUCERE.....	ix
I. PARTEA GENERALĂ.....	1
1. EPIDEMIOLOGIA, ORIGINEA ȘI DEZVOLTAREA TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	2
1.1. EPIDEMIOLOGIA TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE...	2
1.2. CELULELE INTERSTIȚIALE CAJAL.....	3
1.3. PATOGENEZA ȘI DETERMINISMUL GENETIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	5
2. DIAGNOSTICUL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	10
2.1. DIAGNOSTICUL CLINIC ȘI PARACLINIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	10
2.2. ASPECTE MACROSCOPICE ÎN TUMORILE STROMALE GASTROINTESTINALE.....	14
2.3. DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE. DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL.....	15
2.4. DIAGNOSTICUL IMUNOHISTOCHIMIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	18
2.5. CATEGORII PARTICULARE.....	21
2.5.1. EGIST.....	21
2.5.2. TRIADA CARNEY.....	22
2.5.3. SINDROMUL CARNEY STRATAKIS.....	23
2.5.4. SINDROMUL GISTURILOR FAMILIALE.....	23
2.5.5. GIST LA PACIENȚII CU NEUROFIBROMATOZĂ TIP I.....	23
2.5.6. GISTURI PEDIATRICE.....	24
3. STRATIFICAREA RISCULUI ȘI TRATAMENTUL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	26
3.1. PROGNOSTICUL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE..	26
3.2. MANAGEMENTUL TERAPEUTIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	29

4. RĂSPUNSUL IMUN ANTITUMORAL.....	33
4.1. NOȚIUNI GENERALE.....	33
4.2. RĂSPUNSUL IMUN ANTITUMORAL ÎN TUMORILE STROMALE GASTROINTESTINALE.....	37
II. PARTEA SPECIALĂ (CONTRIBUȚII PERSONALE).....	38
5. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII.	39
6. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII.....	41
7. STUDIUL CLINIC ȘI EPIDEMIOLOGIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	46
7.1. INTRODUCERE	46
7.2. MATERIALE ȘI METODE	46
7.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	47
7.4. DISCUȚII.....	63
8. STUDIUL MORFOLOGIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	68
8.1. INTRODUCERE.....	68
8.2. MATERIALE ȘI METODE.....	68
8.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	69
8.4. DISCUȚII.....	94
9. STUDIUL GRUPURILOR PROGNOTICE ȘI AL RISCULUI DE PROGRESIE A BOLII.....	98
9.1. INTRODUCERE.....	98
9.2. MATERIALE ȘI METODE.....	98
9.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	99
9.4. DISCUȚII.....	113
10. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL TUMORILOR STROMALE GASTROINTESTINALE.....	117
10.1. INTRODUCERE.....	117
10.2. MATERIALE ȘI METODE.....	117
10.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	118
10.4. DISCUȚII.....	147
11. STUDIUL INFILTRATULUI INFLAMATOR ÎN TUMORILE STROMALE GASTROINTESTINALE.....	151

11.1. INTRODUCERE.....	151
11.2. MATERIALE ȘI METODE.....	151
11.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	153
11.4. DISCUȚII.....	187
12. STUDIUL EXPRESIEI PD-L1 ÎN TUMORILE STROMALE	
GASTROINTESTINALE.....	190
12.1. INTRODUCERE	190
12.2. MATERIALE ȘI METODE.....	190
12.3. REZULTATELE CERCETĂRII.....	191
12.4. DISCUȚII.....	205
13. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	207
13.1. CONCLUZII.....	207
13.2. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	212
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	214
ANEXE.....	235

**LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE DE
SPECIALITATE:**

1. **Rosulescu A**, Costache M, Dumitru A, Sajin M. Expression of PD-L1 and immune cells in gastrointestinal stromal tumours. Arch Balk Med Union. 2021; 56(3):284-290. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.3.01>
2. **Roșulescu A**, Pechianu N C, Hortopan M, Mihai M, Dima S O, Stroescu C, Zamfir R, Brașoveanu V, Leonard D, Vasilescu C, Popescu I, Herlea V. Gastrointestinal stromal tumors of the colon and rectum. Polish Journal of Pathology. 2020; 71(3):200-206. <https://doi.org/10.5114/pjp.2020.99786>
3. **Roșulescu A**, Croitoru A, Iorgescu A, Becheanu G, Procop A, Tomulescu V, Croitoru V, Herlea V. Mutational Analysis in Gastrointestinal Stromal Tumors - A Series of Three Cases. Surg. Gastroenterol. Oncol. 2020; 25(4):213-220. <https://www.sgo-iasgo.com/pdfs/2020-4-213.pdf>

Co-autor:

4. Herlea V, **Roșulescu A**, Calotă VC, Croitoru V, Stoica Mustafa E, Vasilescu C, Alexandrescu S, Dumitrașcu T, Popescu I, Dima S O, Sajin M. Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and Inflammatory Microenvironment in Gastrointestinal Stromal Tumors. Medicina. 2022; 58(2):174. <https://doi.org/10.3390/medicina58020174>
5. Herlea V, **Rosulescu A**, Iorgescu A, Dima SO, Dumitrascu T, Brasoveanu V, Stroescu C, Vasilescu C, Popescu I. The Immune Response in Gastrointestinal Stromal Tumors. J Cancer Res Immunooncol. 2020; 6:125. <https://www.longdom.org/open-access/the-immune-response-in-gastrointestinal-stromal-tumors.pdf>

1. PROBLEMA FUNDAMENTALĂ

Tumorile stromale gastrointestinale (GIST) reprezintă cel mai frecvent tip de tumori mezenchimale de la nivelul tractului digestiv, cu origine la nivelul celulelor interstițiale Cajal. Constituie aproximativ 1% din totalitatea tumorilor maligne cu această localizare, fiind tumori cu agresivitate și evoluție variabilă [1]. Incidența GISTurilor este de cuprinsă între 4 și 21 la un milion de locuitori, conform studiilor disponibile, variind în funcție de arealul geografic. Cele mai multe cazuri sunt înregistrate la pacienți între 60-65 de ani, deși pot apărea la orice categorie de vârstă [2].

Patogeneza acestora are la bază, în majoritatea cazurilor, mutații activatoare ale tirozin-kinazei KIT, interesând cu precădere patru exoni: 11 (cel mai frecvent), 9 (asociate cu o sensibilitate redusă la imatinib), 13 și 17. PDGFRA face de asemenea parte din clasa tirozin-kinazelor și mutațiile la acest nivel sunt mutual exclusive cu cele ale kit în GIST, apărând în 10-15% din cazuri și afectând predominant exonii 18, 12 și 14. Ulterior s-au descoperit și alte tipuri de mutații, mult mai rare, precum cele de la nivelul NF1, BRAF, KRAS, SDH etc. Genotiparea GISTurilor are importanță terapeutică, constatându-se că anumite tipuri de mutații asociază sensibilitate diferită la inhibitori de tirozin-kinaze (TKI) și evoluție clinică diferită [3-4].

Acest tip tumoral poate apărea la orice nivel al tubului digestiv, de la esofag până la rect, stomacul și intestinul subțire fiind cele mai frecvente localizări. Există însă și cazuri cu localizare în afara tractului gastro-intestinal, cel mai frecvent la nivelul mezenterului, omentului (80% din cazuri), retroperitoneului etc. Tumorile cu asemenea localizări au fost denumite EGISTuri (tumori stromale extragastrointestinale) [5-6]. Din punct de vedere clinic, manifestările sunt extrem de variabile, reflectând localizarea și dimensiunea tumorală, cel mai frecvent fiind raportată hemoragia digestivă. În unele cazuri acestea sunt asimptomatice și descoperite incidental, în timpul evaluărilor imagistice pentru alte afecțiuni [7].

Din punct de vedere macroscopic, tumorile stromale gastrointestinale au dimensiuni variabile, de la infracentimetrice, la peste 20 cm diametru. De obicei sunt circumscrise, înconjurată ocazional de o pseudocapsulă. Masele tumorale se pot dezvolta intraluminal, cu

posibila ulceratie a mucoasei supraincidente, intramural sau subseros. Pe suprafata de sectiune, culoarea variaza de la cenușiu-albicios la roșu-brun, în funcție de gradul de vascularizare și prezența hemoragiei. Aspectul poate fi omogen sau poate exista o variabilitate a culorii și consistenței. De cele mai multe ori tumora este solidă, de consistența elastică, putând exista arii chistice și de necroză. Unele tumori de talie mare pot fi degenerate chistic central, dezvoltând un aspect pseudodiverticular, centrul tumorii comunicând cu lumenul intestinal printr-un traiect fistulos. În unele cazuri, tumora poate căpăta un aspect de clepsidra, cu o componentă extrinsecă și una intraluminală [8].

Din punct de vedere histopatologic, tumorile stromale gastrointestinale s-au dovedit a fi extrem de heterogene, având un spectru morfologic foarte larg. Ele pot fi alcătuite din celule fusiforme (70 % din cazuri), epitelioid (20%) sau un amestec al acestor tipuri (10%). Trăsături precum pleomorfismul cito-nuclear, hiper celularitatea, sclero-hialinizarea, palisadarea nucleară, necroza tumorală, calcificările, vacuolizările citoplasmice, fibrele skenoide etc., pot caracteriza aceste tumori. Rata mitotică poate înregistra valori diferite, cele <5/50 HPF având un prognostic mai bun [1,9]. Diagnosticul diferențial microscopic al tumorilor stromale gastrointestinale se face cu alte tumori, în mare parte de origine mezenchimală, cu localizare digestivă. Printre acestea se numără leiomiome, leiomiomasarcome, schwannome, polipi fibroizi inflamatori, tumori miofibroblastice inflamatorii, fibromatoza desmoidă, melanoame etc [10].

Din punct de vedere imunohistochimic, majoritatea GISTurilor sunt pozitive difuz și intens pentru CD117 (KIT), exprimat în mod normal în celulele interstițiale Cajal, în care își au originea aceste tumori. DOG1 are o sensibilitate și o specificitate comparabilă cu markerul precedent, rolul patologic al acestuia fiind incomplet elucidat. CD34 este pozitiv în majoritatea GISTurilor gastrice, însă negativ în cele mai multe cazuri cu alte localizări. Un procent semnificativ de cazuri poate exprima markeri musculari netezi (SMA, desmină, caldesmon) sau neurali (S100). Ki67 este folosit ca indice de proliferare celulară, valori mari ale acestuia indicând risc crescut de recurență [11, 12].

O serie de sindroame congenitale asociază GISTuri, printre acestea numărându-se Neurofibromatoza tip I, triada Carney (GIST, paragangliom extra-adrenal și condrom pulmonar), sindromul Carney-Stratakis (GIST și paragangliome) [13].

În ceea ce privește stratificarea riscului, există mai multe sisteme de clasificare. Unul dintre ele este NIH (National Institutes of Health), elaborat de Fletcher et al în 2002, care

împarte pacienții în patru grade de risc: foarte scăzut, scăzut, intermediar și înalt, coroborând dimensiunea tumorală și rata mitotică. În 2006, Miettinen et al au propus sistemul de clasificare cunoscut drept AFIP (Armed Forces Institute of Pathology), în care și localizarea tumorală este luată în calcul, după ce au constatat că tumorile gastrice au un risc de recidivă mai scăzut decât cele cu alte localizări, în cazul acelorași dimensiuni și rată mitotică. Astfel rezultă 8 grupuri prognostice (1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6a și 6b). În 2008, Joensuu propune criteriile NIH modificate, care consideră în plus ruptura tumorală ca factor de prognostic negativ [14-17]. Statusul mutațional reprezintă de asemenea un factor de prognostic. Cel mai bun prognostic se asociază cu mutațiile de la nivelul exonului 12 al PDGFRA, exonului 11 al KIT și de la nivelul BRAF. Mutațiile de la nivelul exonului 18 al PDGFRA și 9 al KIT se asociază cu un prognostic nefavorabil [18]. Unele studii susțin că indicele de proliferare Ki 67 poate fi utilizat în determinarea potențialului malign al GIST [19].

În tratamentul GISTurilor se impune o abordare multidisciplinară ce implică gastroenterologul, radiologul, chirurgul, anatomopatologul, oncologul, în funcție de caz [20]. Tratamentul chirurgical are potențial curativ, în condițiile în care se realizează o rezecție completă, marginile sunt negative pentru celule neoplazice și nu se produce ruptură tumorală [21]. În tumorile cu risc crescut este recomandat tratamentul adjuvant cu inhibitor de tirozin-kinază, prima linie fiind reprezentată de Imatinib, asociat cu o creștere a supraviețuirii totale și fără progresie a bolii [22]. Pentru cazurile rezistente la Imatinib, alternativele terapeutice sunt reprezentate de Sunitinib și Regorafenib [23, 24].

Tumorigeneza, în GIST, precum și în general, este un proces dinamic complex, micromediul tumoral fiind în stransă conexiune cu celulele neoplazice pe tot parcursul dezvoltării tumorale [25]. Sistemul imun are rolul de a monitoriza și asigura menținerea homeostaziei prin eliminarea celulelor cu defecte. Este bine cunoscut faptul că tumorile prezintă antigene ce induc un răspuns imun datorită produșilor proteici pe care-i sintetizează și care sunt percepuți ca non-self de către sistemul imun. În cadrul interacțiunilor complexe dintre celulele tumorale și sistemul imunitar au fost descrise trei faze: *eliminare* - când celulele tumorale sunt distruse, *faza de echilibru* - în care funcțiile celulelor imune cu rol antitumoral și a celor cu rol imunosupresor sunt în balanță și *faza de evadare*, în care tumora începe să crească progresiv devenind clinic aparentă și micromediul tumoral este dominat de imunosupresie [26]. Infiltratul inflamator intratumoral diferă din punct de vedere cantitativ și calitativ de la tumoră la tumoră însă este incontestabil faptul că sistemul imunitar

încearcă să contracareze progresia tumorală în cadrul așa-numitei supravegheri imune. Numeroase studii au corelat infiltratul inflamator intratumoral cu un prognostic mai bun și o supraviețuire mai îndelungată [27].

Studiile despre infiltratul imun intratumoral în GIST sunt limitate, arătând că sistemul imun este activ în microclimatul acestora, și potențează efectele tratamentului cu imatinib. S-a dovedit că macrofagele sunt subtipul cel mai frecvent întâlnit, urmate de limfocite CD3+ și de asemenea, că macrofagele se regăsesc în număr mult mai mare în metastaze, comparativ cu tumorile primare. De asemenea numărul de macrofage este superior în subtipul cu celule epitelioide, în tumorile cu dimensiuni mari și rată mitotică crescută [28-30]. În strânsă legătură cu infiltratul inflamator intratumoral se află expresia moleculelor de tip “check-point”. Printre acestea se numără și PD-L1, prezent pe suprafața celulelor neoplazice, acesta fiind ligand al PD-1, prezent pe suprafața celulelor T citotoxice activate. În cazul interacțiunii PD1-PD-L1, are loc diminuarea atacului imun asupra celulelor tumorale, acestea supraviețuind. În GIST, expresia PD-L1 s-a dovedit că reprezintă un factor de prognostic negativ. Pe de altă parte, un avantaj ar putea reieși din abordarea terapeutică a căii PD1-PD-L1, imunoterapia asociată tratamentului convențional putând îmbunătăți supraviețuirea pacienților cu GIST, în cazuri selecționate. Aceasta este însă în prezent doar o ipoteză care este necesar a fi verificată în cadrul studiilor clinice [31]. Toate aceste caracteristici evidențiază complexitatea GISTurilor și importanța cunoașterii factorilor cu rol prognostic sau care pot fi abordați terapeutic, astfel încât managementul pacientului să fie unul adecvat, cât mai adaptat particularităților cazului.

Prezenta lucrare abordează problema antemenționată prin studierea aspectelor demografice, clinice, histologice și imunohistochimice ale GIST și totodată prin analizarea relației dintre celulele tumorale și micromediul imun, mai exact expresia PD-L1 la nivelul celulelor neoplazice și caracteristicile infiltratului inflamator intratumoral. Prima parte a prezentului studiu doctoral – partea generală - este dedicată prezentării noțiunilor teoretice, care evidențiază stadiul actual al cunoașterii și importanța aprofundării subiectului ales. A doua parte – partea specială – înfățișează studiile realizate, cu obiectivele particulare și rezultatele obținute, pentru ca în final să fie enunțate concluziile. Rezultatele acestei lucrări științifice vor contribui la o mai bună cunoaștere a caracterelor clinico-patologice și imunohistochimice a GISTurilor, a răspunsului imun antitumoral în cazul acestei entități și a implicației prognostice a variabilelor analizate.

2. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII

Prezenta cercetare doctorală are drept **scop** analiza aprofundată a tumorilor stromale gastrointestinale prin studiul caracterelor clinice, morfopatologice și imunohistochimice, în vederea unei mai bune înțelegeri a implicațiilor prognostice ale acestor variabile. De asemenea, lucrarea de față își propune punerea în evidență a rolului micromediului tumoral în dinamica bolii, prin studierea infiltratului inflamator intratumoral și a expresiei PD-L1 la nivelul celulelor tumorale urmată de evaluarea corelațiilor dintre acestea și factorii de prognostic.

Obiectivele studiului cuprind:

1. *Analiza caracteristicilor generale, demografice și clinice ale tumorilor stromale gastrointestinale* – în care vor fi detaliate caracteristicile pacienților precum sexul, vârsta, mediul de proveniență, afecțiunile asociate/ antecedentele personale patologice, semnele și simptomele la prezentare, însă și caracteristici tumorale cu implicații asupra simptomatologiei clinice precum localizarea, caracterul primar/secundar tumoral, uni-/multifocalitatea tumorală și dimensiunea maximă tumorală. De asemenea va fi evaluată existența asocierilor și corelațiilor între aceste variabile, precum și impactul asupra supraviețuirii.
2. *Analiza caracterelor morfologice* – în care vor fi raportate cele mai frecvente aspecte macroscopice tumorale și vor fi detaliate aspectele microscopice (tip celular tumoral, rata mitotică, prezența necrozei tumorale, a ulcerăției, a pleomorfismului celular, a existenței particularităților morfologice precum vacuolizările citoplasmatiche, fibrele skenoide, palisadarea nucleară), cu iconografie reprezentativă. Totodată, se va testa existența asocierilor și corelațiilor cu alte variabile clinico-patologice și prognostice, precum și modul în care influențează supraviețuirea.
3. *Încadrarea cazurilor individuale în grupuri prognostice și clase de risc*, conform schemelor propuse de AFIP și NIH, luând în considerare dimensiunea tumorală, rata mitotică și localizarea, cu analiza detaliată a acestora, și evidențierea eventualelor corelații și asocieri cu alte variabile clinico-patologice, precum și compararea supraviețuirii între categorii.

4. **Studierea expresiei imunohistochimice** a markerilor uzuali, utilizați pentru diagnosticul pozitiv (CD117, DOG1, CD34) și diferențial (SMA, S100), precum și a indicelui de proliferare Ki67. De asemenea vor fi evaluate corelațiile imunoexpresiei acestor markeri cu alte variabile clinico-patologice și morfologice tumorale precum și supraviețuirea.
5. **Studiul morfologic și imunohistochimic al infiltratului inflamator intratumoral** - cu descrierea patternului și distribuției în diversele categorii tumorale, punerea în evidență a imunofenotipului celulelor inflamatorii (CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+) și cuantificarea acestora cu ajutorul unui software specializat. Ulterior, vor fi testate corelațiile și asocierile acestor date cu variabilele clinico-patologice, morfologice, imunohistochimice și prognostice și impactul asupra supraviețuirii.
6. **Studiul expresiei PD-L1 în celulele tumorale** prin testare imunohistochimică, cuantificarea pozitivității și determinarea relației cu infiltratul inflamator intratumoral și cu alte variabile clinico-patologice, morfologice, imunohistochimice și prognostice și de asemenea verificarea influenței asupra supraviețuirii.

3. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

Prezentul studiu doctoral are la bază analiza retrospectivă a cazurilor de tumori stromale gastro-intestinale diagnosticate în două mari centre universitare din București: Spitalul Universitar de Urgență București și Institutul Clinic Fundeni, de-a lungul unei perioade de 4 ani (2015-2018), tratate în secțiile de chirurgie ale spitalelor menționate și diagnosticate histopatologic în departamentele de Anatomie Patologica ale aceluiași instituții. Lotul a totalizat un număr de 96 de cazuri. Din fișele de însoțire, registrele histopatologice și bazele de date interne ale spitalelor au fost extrase principalele date clinice (vârstă, sex, mediul de proveniență, localizarea anatomică a tumorilor, data diagnosticului), aspectele macro- și microscopice ale tumorilor, diagnosticul histopatologic, expresia imunohistochimică, grupul prognostic în care se încadrează și riscul de progresie a bolii, realizându-se o bază de date.

Analiza microscopică s-a realizat cu ajutorul microscopului optic, urmărindu-se detalii precum tipul celular, rata mitotică, pleomorfismul cito-nuclear, prezența necrozei, a ulcerăției, a vacuolizărilor citoplasmaticice, a fibrelor skenoide și palisadării nucleare, infiltratul inflamator intratumoral. Concomitent s-au realizat și fotografiile reprezentative cu ajutorul camerelor încorporate.

Analiza imunohistochimică a fost necesară în primul rând pentru confirmarea diagnosticului de GIST, în final, toate cazurile incluse în studiu având această confirmare, prin pozitivitatea CD117 și/sau DOG1. Acolo unde particularitățile tumorale au impus adăugarea unor teste suplimentare, au fost folosiți imunomarkeri pentru diagnostic diferențial (SMA, S100, CD34, Desmina, AE1/AE3 etc).

Din acest lot principal s-a ales un lot secundar alcătuit din 90 de cazuri de GIST pentru care s-a realizat analiza morfologică și imunohistochimică a infiltratului inflamator intratumoral, și un lot de 89 de cazuri pentru care s-a testat expresia PD-L1 la nivelul celulelor tumorale. După finalizarea testelor, a fost completată o bază de date care a stat la baza calculelor statistice.

Criterii de includere:

- Cazurile înregistrate în cadrul departamentelor de Anatomie Patologica ale Spitalului Universitar Urgență București (SUUB) și Institutului Clinic Fundeni
- Cazurile diagnosticate histopatologic drept tumori stromale gastrointestinale.
- Cazurile cu confirmare imunohistochimică a diagnosticului histopatologic

Criterii de excludere:

- Cazurile înregistrate în afara intervalului 2015-2018
- Cazurile la care informațiile clinico-patologice esențiale nu au fost accesibile
- Cazurile în care diagnosticul histopatologic a fost infirmat imunohistochimic

Pentru **analiza statistică**, variabilele eșantionului studiat au fost colectate într-o bază de date în programul Microsoft Excel 2016. Analiza statistică s-a efectuat în programul IBM SPSS Statistics 20. Pentru verificarea asocierilor intervariabile s-a utilizat testul Chi-Square, corecțiile corespunzătoare atunci când criteriile nu au fost îndeplinite (Likelihood ratio, Fisher test) și parametrii Phi și Cramer V pentru stabilirea mărimii efectului; testul t-independent cu raportarea gradelor de libertate, diferența mediilor, testul Levene's pentru testarea omogenității, testele de normalitate Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk pentru subgrupurile sub 30 de respondenți. Intervalul de încredere a fost setat la 95%. Pentru situația în care condițiile testelor de normalitate nu au fost îndeplinite s-a utilizat testul non-parametric Mann-Whitney U și Kruskal-Wallis. Pentru testarea corelațiilor s-a utilizat testul Pearson r. Rezultatele au fost prezentate numeric și grafic. Pentru **studiul supraviețuirii** s-au realizat curbe Kaplan-Meier, pentru variabile categorice și regresie Cox pentru variabile continue.

4. PARTEA SPECIALĂ - SINTEZA CAPITOLELOR

4.1. Studiul I: Studiul clinic și epidemiologic al tumorilor stromale gastrointestinale

Acest studiu (dezvoltat în capitolul 7 al tezei de doctorat) și-a propus să analizeze în amănunt caracterele demografice și clinice ale GISTurilor în vederea unei mai bune înțelegeri a implicațiilor prognostice ale acestor variabile. Astfel au fost evaluate vârsta și sexul pacienților, mediul de proveniență, semnele și simptomele, antecedentele personale patologice, caracterul uni-multifocal tumoral, caracterul primar/secundar al tumorii, localizarea și dimensiunea tumorală. De asemenea, s-a testat existența unor corelații sau asocieri între variabile precum și felul în care acestea influențează supraviețuirea. Rezultatele au fost comparate cu cele din literatura de specialitate.

Studiul s-a desfășurat pe o cohortă constituită din 96 de pacienți diagnosticați cu GIST. Aceștia au avut vârste cuprinse între 28 și 78 de ani, vârsta medie fiind de 58.2 ani. Numărul de cazuri a fost ușor crescut în favoarea sexului masculin (52.1% bărbați versus 47.9% femei). La sexul feminin s-au înregistrat vârste între 31 și 73 de ani, cu o medie de 57.3 ani, iar la sexul masculin vârstele au fost cuprinse între 28 și 78 de ani, cu o medie de 58.9 ani. Majoritatea pacienților au provenit din mediu urban (69.8%). Semnele și simptomele cel mai frecvent întâlnite în cadrul cohortei au fost cele asociate hemoragiei digestive (39.5%)

Din categoria tumorilor primare, cel mai mare număr de cazuri a fost înregistrat la nivel gastric (N = 50), urmat de intestin subțire (N = 18), localizarea extragastrointestinală (N = 9), colon (N = 2) și rect (N = 2). De asemenea, lotul a cuprins 7 cazuri de recidive tumorale și 8 de metastaze. Dimensiunile tumorilor stromale gastrointestinale din lotul studiat au fost cuprinse între 0.5 și 21 cm, cu o medie de 6.953 cm.

Majoritatea tumorilor au avut un caracter unifocal, mai frecvent cele de la nivelul tubului digestiv, multifocalitatea caracterizând mai adesea determinările secundare și EGISTurile. În plus, tumorile multifocale au înregistrat dimensiuni superioare celor unifocale (media de 9.18 cm versus 6.44 cm). Nu au existat alte asocieri și corelații semnificative între variabilele analizate și acestea nu s-a dovedit a avea impact asupra supraviețuirii, în cadrul lotului studiat.

4.2. Studiul II: Studiul morfologic al tumorilor stromale gastrointestinale

Variabilitatea GISTurilor nu se regăsește doar la nivelul comportamentului clinic și al evoluției bolii, ci și la nivel morfologic. În acest context, actualul studiu (dezvoltat în capitolul 8 al tezei de doctorat) și-a propus să analizeze în detaliu aspectele macro- și microscopice ale tumorilor stromale gastrointestinale aparținând lotului selectat, să evalueze particularitățile morfologice, să constate frecvența lor și să testeze existența de asocieri și corelații între acestea și alte variabile clinico-patologice, precum și impactul asupra supraviețuirii. Rezultatele au fost ulterior comparate cu datele existente în literatura de specialitate, în mare parte fiind concordante cu acestea. Studiul de față a cuprins un număr total de 96 de pacienți diagnosticați cu GIST.

Din punct de vedere macroscopic, cele mai multe GISTuri de la nivelul tractului digestiv au fost descrise ca tumori nodulare, circumscrise, intramurale, cu localizare submucoasă, extinse subseros, și chiar invadând organele din jur. Recidivele, metastazele și EGISTurile au fost descrise ca formațiuni tumorale nodulare. Aspecte particulare au fost reprezentate de arii chistice, hemoragice, de necroză, zone abcedate și ulceratie în suprafață

Din punct de vedere microscopic, GISTurile din lotul studiat au fost constituite, în marea majoritate a cazurilor, din celule fusiforme (65.6%), pe locul doi ca frecvență fiind celularitatea mixtă (28.1 %), și pe ultimul loc tipul celular epitelioid (6.3%). Tipul celular s-a asociat semnificativ cu dimensiunea tumorală, tumorile cu celularitate mixtă având dimensiuni mai mari. Prezența vacuolelor citoplasmice este mai frecvent întâlnită în tumorile primare, unifocale, la nivel gastric și mai rar în determinările secundare. Palisadarea nucleară a fost înregistrată în 13.5% din totalul lotului studiat cu o frecvență mai ridicată în tumorile gastrice, succedate de cele de intestin subțire și EGIST. Prezența fibrelor skenoide a fost întâlnită în 7.3% din totalul cazurilor lotului studiat în tumori gastrice și de intestin subțire. Pleomorfismul cito-nuclear marcat s-a regăsit cu o frecvență superioară în EGISTuri (din categoria tumorilor primare), și mai des în tumorile secundare (recidive și metastaze) în comparație cu tumorile primare. De asemenea, pleomorfismul marcat a fost mai frecvent în rândul tumorilor de mari dimensiuni.

Necroza intratumorală a fost adesea întâlnită în cazurile lotului studiat (45.8%), atât în tumorile primare, indiferent de localizare, cât și în cele secundare, mai frecvent în tumorile de talie mare. De asemenea, ulcerarea a fost mai frecvent întâlnită în tumorile cu dimensiuni mai mari. O rată mitotică crescută (>5 mitoze/50HPF) a fost mai des întâlnită în determinările secundare (recidive + metastaze), în comparație cu tumorile primare. Variabilele analizate s-a dovedit ca nu influențează semnificativ supraviețuirea, în cadrul lotului studiat.

4.3. Studiul III: Studiul grupurilor prognostice și al riscului de progresie a bolii

Tumorile stromale gastrointestinale au un spectru biologic larg, de la tumori de talie mică, benigne, la sarcoame fatale [1]. Stratificarea riscului are rolul de a evalua posibilitatea unei evoluții nefavorabile și de a selecta pacienții care ar putea beneficia de tratament adjuvant. Clasificarea prognostică a tumorilor stromale gastrointestinale se bazează în prezent pe trăsături precum localizarea anatomică, dimensiunea tumorală, rata mitotică, ruptură tumorală și statusul mutational [32]. Aceasta nu este însă ideală, rolul altor variabile tumorale nefiind pe deplin elucidat. Cele mai larg uzitate sisteme prognostice în prezent sunt AFIP și NIH revizuit, care delimitează grupuri prognostice, respectiv clase de risc, coroborând localizarea, dimensiunea și numărul de mitoze/50HPF [15-17]. Prezentul studiu (dezvoltat în capitolul 9 al tezei de doctorat) s-a desfășurat pe un lot de 81 de tumori primare, propunându-și să stratifice riscul folosind ambele sisteme de clasificare și să evalueze existența de asocieri și corelații cu alte variabile clinico-patologice, în încercarea de a deduce un posibil rol prognostic al acestora din urmă. De asemenea a fost testat și impactul asupra supraviețuirii al grupurilor prognostice și a riscului de progresie a bolii.

În ceea ce privește împărțirea în grupuri prognostice, conform Miettinen/ AFIP, lotul studiat a cuprins cazuri aparținând tuturor celor 8 clase, cei mai mulți reprezentanți fiind incluși în grupul 2. Din punct de vedere morfologic, tipul celular mixt s-a asociat semnificativ cu un grad prognostic înalt. De asemenea tumorile cu pleomorfism ridicat s-au

încadrat mai frecvent în grupuri prognostice înalte. Necroza și ulcerația s-au întâlnit mai des în tumorile cu grad prognostic mare.

În urma împărțirii tumorilor primare în clase de risc de progresie a bolii, conform criteriilor NIH revizuite, lotul studiat a avut reprezentanți în toate cele 4 categorii, dominând riscul scăzut. Din punct de vedere morfologic, celularitatea fusiformă tumorală s-a asociat cu un risc scăzut de progresie a bolii, pe când cea mixtă cu un risc mai ridicat. Pleomorfismul cito-nuclear moderat și înalt s-a asociat cu un risc crescut. Prezența necrozei a fost mai frecventă în tumorile cu risc crescut, și de asemenea și ulcerația tumorală. Tumorile multifocale au fost semnificativ statistic mai frecvent asociate cu risc înalt decât tumorile unifocale.

4.4. Studiul IV: Studiul imunohistochimic al tumorilor stromale gastrointestinale

Datorită heterogenității morfologice, tumorile stromale gastrointestinale necesită confirmare imunohistochimică pentru diagnostic de certitudine. Pentru diagnosticul pozitiv al GIST în practica curentă, sunt utilizați CD117 și DOG1, markeri cu sensibilitate și specificitate crescută și de asemenea CD34, cu sensibilitate crescută, însă specificitate redusă. Pentru excluderea altor diagnostice diferențiale, sunt adesea incluși în panelul de markeri utilizați și S100 – pozitiv în tumorile cu origine nervoasă și SMA – care evidențiază diferențierea musculară netedă. Indicele de proliferare Ki67 poate avea un spectru larg de valori în cazul acestei entități tumorale, cu un impact prognostic incomplet elucidat [33].

În cadrul prezentului studiu (dezvoltat în capitolul 10 al tezei de doctorat), nu au existat diferențe semnificative statistic între tumorile CD117 pozitive și cele CD117 negative în ceea ce privește caracteristicile morfo-patologice, cu excepția pleomorfismului cito-nuclear, care a fost predominant moderat în cazurile CD117 +. Expresia SMA a fost mai frecvent întâlnită la sexul masculin. Tumorile SMA negative au avut mai frecvent dimensiuni mari. De asemenea, riscul de progresie a bolii a fost diferit semnificativ statistic în relație cu expresia SMA, cazurile SMA pozitive având mai frecvent risc scăzut. Expresia S100 nu a înregistrat asocieri semnificative statistic cu alte variabile prognostice.

În ceea ce privește valoarea indicelui de proliferare Ki67 aceasta a fost semnificativ mai mare în determinările secundare, în tumorile cu dimensiuni crescute, în asociere cu tipurile celulare epitelioid și mixt, în tumorile cu pleomorfism marcat. Pe de altă parte, Ki67

a fost mai mic în prezența unor particularități morfologice precum vacuolizările citoplasmatică și fibrele skenoide. Ki67 s-a asociat cu necroza intratumorală, aceasta din urmă fiind prezentă mai frecvent în tumorile cu indice de proliferare crescut. Valoarea Ki 67 s-a asociat de asemenea semnificativ statistic cu rata mitotică, la o rată peste 5 mitoze/50HPF procentul Ki67 crescând. În relație cu gradul prognostic și riscul de progresie a bolii, procentul Ki67 a crescut în același sens cu acestea. Tumorile multifocale au avut un indice de proliferare superior tumorilor unifocale.

Studiul supraviețuirii nu a evidențiat diferențe semnificative statistic între pacienții cu GISTuri cu expresie imunohistochimică diferită, în cadrul lotului studiat.

4.5. Studiul V: Studiul infiltratului inflamator în tumorile stromale gastrointestinale

Rolul micromediului inflamator este încă incomplet elucidat în cancer. Răspunsul imun antitumoral variază în funcție de tipul tumorii dar și de particularitățile pacientului. Studiile asupra acestui subiect au descoperit implicații în determinarea prognosticului bolii și în dezvoltarea imunoterapiei [34].

În prezentul studiu (dezvoltat în capitolul 11 al tezei de doctorat), infiltratul inflamator asociat tumorii a fost analizat într-un număr total de 90 de cazuri. Într-o primă fază, evaluarea celulelor inflamatorii a fost una globală, realizată pe lamele colorate uzual, cu hematoxilin-eozină. În acest scop, a fost selectată câte o lamă reprezentativă pentru fiecare caz și a fost evaluat exclusiv infiltratul inflamator intratumoral. Din blocul corespondent s-au efectuat și teste imunohistochimice pentru determinarea fenotipului celulelor inflamatorii (CD3, CD4, CD8, CD20 și CD68). Analiza calitativă a presupus aprecierea tipului de celule inflamatorii (PMN, macrofage, limfocite), a densității și a patternului de distribuție (difuz, nodular, perivascular). Pentru analiza cantitativă, s-au efectuat câte 5 fotografii ale unor câmpuri cu putere mare de mărire (400 X) de pe aceeași lamă, cu aspecte reprezentative pentru caz. Ulterior, cu ajutorul unui software specializat în analiza imaginilor (ImageJ) au fost numărate celulele inflamatorii de pe câmpurile selectate. Pentru fiecare caz a fost calculată o medie a numărului de celule imune (totale, evaluate pe colorația uzuală H&E și pentru fiecare subtip în parte – determinat imunohistochimic), numărul rezultat fiind atribuit cazului.

Rezultatele analizei calitative au identificat o distribuție variabilă, fie difuză, cu celule izolate și grupate, fie sub formă de agregate ce se dispun predominant perivascular și în periferia tumorii. În majoritatea cazurilor au fost întâlnite mai multe patternuri în cadrul aceleiași tumori. Tipul principal de celule imune prezent a fost reprezentat de limfocite, urmat de histiocite și mai rar de plasmocite, mastocite, eozinofile. Neutrofilele s-au regăsit preponderant în vecinătatea ulcerățiilor.

La analiza cantitativă, efectuată pe colorația uzuală Hematoxilină-Eozină, numărul de celule inflamatorii a fost variabil și nu a înregistrat diferențe semnificative statistic între diversele localizări tumorale, categorii dimensionale, rate mitotice, grupuri prognostice, clase de risc, categorii de vârstă etc. Singura diferență semnificativă statistic constatată a fost raportată la sexul pacientului, pacienții de sex masculin având o cantitate mai mare de celule imune intratumorale.

În ansamblu, cel mai frecvent subtip celular inflamator mononuclear a fost reprezentat de limfocitele T, urmate de histiocite, pe ultimul loc situându-se limfocitele B.

Din categoria limfocitelor T, cele CD4+ au fost într-o cantitate superioară celor CD8+. Nu au existat diferențe semnificative statistic între numărul total de celule CD3+ și alte variabile clinico-patologice și prognostice. Pe de altă parte, numărul limfocitelor T CD8+ a fost semnificativ mai mare în tumorile ulcerate comparativ cu cele acoperite de mucoasă indemnă și semnificativ mai mică în recidivele tumorale. Un raport CD4/CD8 subunitar a fost mai frecvent întâlnit în tumorile localizate la nivelul intestinului subțire și la cele cu imunoexpresie SMA, iar un raport CD4/CD8 supraunitar s-a asociat mai frecvent cu o rată mitotică > 5 mitoze / 50 HPF și cu dimensiuni tumorale mai mari.

În ceea ce privește numărul de limfocite B intratumorale, acesta a fost mai mic în tumorile multifocale, în comparație cu cele unifocale și de asemenea în recidivele tumorale, spre deosebire de celelalte categorii. Cele mai mari valori ale celulelor CD20+ s-au înregistrat în tumorile primare, în mod particular în EGISTuri. Nu s-au identificat alte asocieri semnificative statistic între numărul de limfocite B și alte variabile morfologice și prognostice.

Cantitatea de histiocite intratumorale a înregistrat variații raportate la dimensiunea tumorală, fiind mai redusă în tumorile de talie mică, și mai mare în cele cu diametrul crescut. Concentrațiile de celule CD68+ au fost mai crescute semnificativ statistic la valori ale ratei mitotice ce au depășit 5 mitoze/ 50HPF. În cazul acestui tip de celule inflamatorii, a existat

o asociere cu riscul de progresie a bolii, cantitatea cea mai mare de histiocite intratumorale înregistrându-se în tumorile cu risc înalt, pe ultimul loc situându-se tumorile cu risc scăzut. În mod similar, în rândul grupurilor prognostice au existat diferențe semnificative. În ceea ce privește morfologia celulară tumorală, tumorile cu celularitate mixtă au avut cel mai mare grad de infiltrație cu histiocite, la polul opus situându-se cele cu celularitate fusiformă. De asemenea tumorile cu pleomorfism marcat și moderat s-au asociat semnificativ cu mai multe celule CD68+ în comparație cu cele cu pleomorfism minim. Prezența fibrelor skenoide în cadrul tumorilor s-a asociat cu un număr semnificativ mai mic de celule CD68+. Raportat la indicii de proliferare Ki67, histiocitele intratumorale au numărat valori semnificativ mai mici în tumorile cu $Ki67 \leq 5\%$.

Referitor la relația dintre diversele categorii de celule imune intratumorale, titrul celulelor imune contabilizate în colorația uzuală, H&E s-a corelat pozitiv cu valorile CD3+, CD20+ și CD8+. De asemenea, valorile CD3 s-au corelat semnificativ, puternic și pozitiv cu valorile CD4, CD20, CD8 iar valorile CD4 s-au corelat semnificativ, puternic și pozitiv cu valorile CD8 și CD68. Numărul de celule imune intratumorale nu a influențat semnificativ statistic durata supraviețuirii.

4.6. Studiul VI: Studiul expresiei PD-L1 în tumorile stromale gastrointestinale

PD-L1 este o moleculă de tip punct de control („checkpoint”) și ligand pentru PD-1. Este exprimat atât în celule imune (limfocite, macrofage, celule dendritice), cât și în celule non-imune, tumorale. Această moleculă este implicată în blocarea răspunsului imun antitumoral și este asociată cu un prognostic negativ în multe tipuri de cancer. Blocarea axei PD-1-PD-L1 poate fi o strategie terapeutică în cazul tumorilor ce exprimă PD-L1. Testarea prezenței acestui marker are utilitate clinică, fiind aprobată în unele tipuri de cancer pentru a verifica răspunsul la tratamentul cu inhibitori de PD-1 [35-37].

În acest studiu (dezvoltat în capitolul 12 al tezei de doctorat) am urmărit evaluarea PD-L1 în tumorile stromale gastrointestinale în relație cu variabilele clinico-patologice, prognostice și infiltratul inflamator intratumoral. În cazurile lotului studiat (89 de cazuri), s-a dovedit că expresia PD-L1 se corelează pozitiv cu vârsta pacienților, aceasta crescând cu

înaintarea în vârstă a bolnavilor. Dintre caracteristicile morfologice, s-a dovedit că palisadarea nucleară se asociază semnificativ statistic cu creșterea valorilor PD-L1. Din punct de vedere imunohistochimic, expresia CD117 s-a asociat semnificativ statistic cu expresia PD-L1.

În relație cu infiltratul inflamator intratumoral, valorile PD-L1 s-au corelat semnificativ statistic cu numărul de celule imune contabilizat pe colorația uzuală. În urma evaluării subtipurilor de celule imune în raport cu expresia PD-L1, s-a constatat ca valorile PD-L1 se corelează semnificativ statistic cu numărul de celule CD3+, CD4+, CD8+, CD20+ și CD68+. Studiul supraviețuirii nu a evidențiat diferențe semnificative statistic între tumorile PD-L1 pozitive și cele negative.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul prezentei cercetări doctorale au fost atinse scopul și obiectivele propuse, ce au gravitat în jurul caracterizării tumorilor stromale gastrointestinale din punct de vedere clinic, morfopatologic, imunohistochimic, al relației cu micromediul inflamator și a identificării rolului prognostic al variabilelor de interes. În acest scop, am testat existența asocierilor și corelațiilor între diverse categorii de variabile și în special cu grupul prognostic și riscul de progresie a bolii. Astfel, tipul celular mixt s-a asociat cu un grup prognostic mai ridicat. De asemenea pleomorfismul citonuclear crescut, prezența necrozei și ulcerăției. În mod similar, aceleași variabile s-au asociat cu un risc crescut de progresie a bolii. În plus, multifocalitatea tumorală s-a asociat mai frecvent cu un risc înalt. Din punct de vedere imunohistochimic, valoarea Ki67 a crescut în același sens cu gradul grupului prognostic, respectiv riscul de progresie a bolii.

Un element de actualitate l-a reprezentat studiul infiltratului inflamator intratumoral, dovedindu-se că celulele imune reprezintă o componentă importantă a micromediului tumoral în majoritatea cazurilor. Subtipul dominant a fost reprezentat de limfocitele T. Cantitatea de histiocite s-a asociat cu grupul prognostic și riscul de progresie a bolii, fiind mai mare în grupurile prognostice superioare și în clasele de risc înalt. Celelalte tipuri de celule inflamatorii nu s-au asociat/corelat cu sistemele de gradare actuale și nu s-a dovedit a influența supraviețuirea.

Un alt element de actualitate a fost reprezentat de testarea expresiei PD-L1 în celulele tumorale, acest marker deschizând calea imunoterapiei în diverse tipuri de cancere. S-a dovedit că GISTurile exprimă această moleculă în cantitate variabilă și că nivelul expresiei se corelează cu cantitatea de celule imune intratumorale, indiferent de subtip. Nu s-a identificat însă o asociere între valoarea PD-L1 și grupul prognostic/riscul de progresie a bolii și nu s-a dovedit a influența supraviețuirea.

Niciuna dintre variabilele evaluate nu s-a dovedit a influența semnificativ statistic supraviețuirea, însă aceste rezultate trebuie interpretate cu prudență întrucât analiza a fost efectuată pe o populație relativ restrânsă, heterogenă (tumori primare și secundare, localizări tumorale diferite), natura retrospectivă a studiului ducând la o pierdere inevitabilă a unor date despre pacient și caz.

Prezentul studiu doctoral s-a confruntat cu o serie de *limitări*, pe de o parte de natură materială, nedispunând de investigații genetice, care să întregescă tabloul tumorilor evaluate până la nivel molecular sau de testare imunohistochimică exhaustivă. Pe de altă parte din punct de vedere al istoricului și tabloului clinic al pacienților, informațiile disponibile nu au fost întotdeauna complete și ulterior urmărirea a fost limitată. Incidența redusă a tumorilor stromale gastrointestinale a făcut ca numărul total de cazuri ce a format lotul investigat să fie unul relativ redus, deși s-a desfășurat pe o perioadă de 4 ani și a inclus bolnavi diagnosticați în două mari centre universitare din București. Astfel nu a fost posibilă obținerea de informații cu semnificație statistică pentru diverse subcategorii tumorale. Natura retrospectivă a studiului a dus, inevitabil, la o pierdere de date. De asemenea, caracterul observațional nu a făcut posibilă evidențierea unor relații cauzale între variabilele analizate, ci doar tendințe de asociere.

Deși s-au făcut progrese considerabile în ultimele decade în înțelegerea biologiei tumorilor stromale gastrointestinale și ulterior în tratamentul acestora, fiind disponibile multiple opțiuni și scheme terapeutice, există în continuare un subset de cazuri rezistente la tratament. Aceste cazuri impun cercetare suplimentară având ca scop descoperirea unor alternative de tratament. Imunoterapia ar putea fi o soluție, însă studiile asupra acestui subiect sunt abia la început și în număr redus. Astfel, expresia PD-L1 și a infiltratului inflamator în GIST ar trebui investigate suplimentar, pe cohorte mai mari și completate cu studii clinice.

Noi *direcții de cercetare* ar putea fi îndreptate înspre:

- expresia PD-L1 în celulele inflamatorii
- elaborarea unui sistem standardizat de cuantificare a PD-L1 și a altor biomarkeri și de asemenea și a celulelor inflamatorii
- răspunsul la tratamentul cu inhibitori de PD-1 al tumorilor PD-L1 pozitive
- semnificația infiltratului inflamator la nivelul marginii de invazie și relația acestuia cu infiltratul inflamator din centrul tumorii
- alte tipuri de celule inflamatorii în GIST (Natural killer, plasmocite, eozinofile etc)
- contribuția inteligenței artificiale în diagnosticul GIST

BIBLIOGRAFIE SELECȚIONATĂ:

1. Gheorghe G, Bacalbasa N, Ceobanu G, Ilie M, Enache V, Constantinescu G et al. Gastrointestinal Stromal Tumors – A Mini Review. *J Pers Med*. 2021; 11(8):694. doi:10.3390/jpm11080694
2. Søreide K, Sandvik OM, Søreide JA, Giljaca V, Jureckova A, Bulusu VR. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiology*. 2016; 40: 39-46. doi:10.1016/j.canep.2015.10.031
3. Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol*. 2006 May; 23(2):91-102. doi: 10.1053/j.semdp.2006.08.006.
4. Niinuma T, Suzuki H, Sugai T. Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jan 9; 3:2. doi: 10.21037/tgh.2018.01.02.
5. Rammohan A, Sathyanesan J, Rajendran K, Pitchaimuthu A, Perumal SK, Srinivasan U et al. A gist of gastrointestinal stromal tumors: A review. *World J Gastrointest Oncol*. 2013;5(6):102-112. doi:10.4251/wjgo.v5.i6.102
6. Hatipoglu E. Extragasrointestinal Stromal Tumor (EGIST): a 16-year experience of 13 cases Diagnosed at a single center. *Med Sci Monit*. 2018; 24:3301-3306. doi:10.12659/MSM.907654
7. Levy AD, Remotti HE, Thompson WM, Sobin LH, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors: radiologic features with pathologic correlation. *RadioGraphics*. 2003; 23:283–304. doi:10.1148/rg.232025146
8. Graadt van Roggen JF, van Velthuysen ML, Hogendoorn PC. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*. 2001; 54:96–103. doi: 10.1136/jcp.54.2.96
9. Miettinen M, Lasota J. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. *J Surg Oncol*. 2011 Dec;104(8):865-73. doi: 10.1002/jso.21945.

10. Dow N, Giblen G, Sobin LH, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol*. 2006 May;23(2):111-9. doi: 10.1053/j.semdp.2006.09.002.
11. Hirota S. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor by histopathology and immunohistochemistry. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018 May 12;3:27. doi: 10.21037/tgh.2018.04.01.
12. Wu CE, Tzen CY, Wang SY, Yeh CN. Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers (Basel)*. 2019 May 16;11(5):679. doi: 10.3390/cancers11050679.
13. Herzberg M, Beer M, Anupindi S, Vollert K, Kröncke T. Imaging pediatric gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Pediatr Surg*. 2018 Sep;53(9):1862-1870. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.03.022.
14. Parab TM, DeRogatis MJ, Boaz AM, Grasso SA, Issack PS, Duarte DA, et al. Gastrointestinal stromal tumors: a comprehensive review. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2019;10(1):144. doi:10.21037/jgo.2018.08.20
15. Fletcher C, Berman J, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33: 459–465. doi:10.1053/hupa.2002.123545
16. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. Review on morphology, molecular pathology, prognosis and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130: 1466-1478. doi:10.5858/2006-130-1466-GSTROM
17. Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Human pathology*. 2008;39(10):1411-9. doi:10.1016/j.humpath.2008.06.025
18. Dei Tos AP, Hornick JL, Miettinen M (2019) Gastrointestinal stromal tumors. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board (Eds). *Digestive System Tumours*. 5th ed. Lyon: IARC. p 439-443.
19. Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, DeMatteo RP, Ganjoo KN, Maki RG et al. NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8 Suppl 2(0 2):S1-41; quiz S42-4. doi: 10.6004/jnccn.2010.0116.
20. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014; 25 (Supplement 3): iii21–iii26. doi:10.3748/wjg.v19.i4.523

21. Nishida T, Blay J-Y, Hirota S, Kitagawa Y, Kang YK. The standard diagnosis, treatment, and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric Cancer*. 2016; 19:3-14. doi:10.1007/s10120-015-0526-8
22. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1640 patients. *J Clin Oncol*. 2010; 28:1247–53. doi:10.1200/JCO.2009.24.2099
23. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5352–9. doi:10.1200/JCO.2007.15.7461
24. Ferraro D, Zalcberg J. Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors: clinical evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2014;6(5):222-228. doi:10.1177/1758834014544892
25. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008; 27(45): 5904–5912. doi:10.1038/onc.2008.271.
26. Mittal D, Gubin M, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*. 2014; 27:16–25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004
27. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from International Immuno-Oncology Biomarkers Working group. Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol*. 2017; 24 (5): 235-251. doi:10.1097/PAP.0000000000000161
28. Van Dongen M, Savage NDL, Jordanova ES, Briaire-de Brujin IH, Walbung KV, Ottenhoff TTM et al. Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int. J. Cancer*. 2010; 127: 899–909. doi: 10.1002/ijc.25113

29. Cameron S, Gieselmann M, Ramadori G, Furesi L. Immune cells in primary and metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7):3563-3579.
30. Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R et al. Immune Infiltrates Are Prognostic Factors in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Res.* 2013; 73(12): 3499-3510. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0371
31. Zhao, R. et al. PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8+ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Cell Prolif.* 2019; 52: e12571, doi:10.1111/cpr.12571
32. Bertucci F, Finetti P, Mamessier E, Pantaleo MA, Astolfi A, Ostrowski J et al. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. *Oncoimmunology.* 2015 Feb 3;4(5):e1002729. doi: 10.1080/2162402X.2014.1002729.
33. Rubin BP, Heinrich MC. Genotyping and immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors: An update. *Semin Diagn Pathol.* 2015; 32(5):392-9. doi:10.1053/j.semdp.2015.02.017
34. Mansuri N, Birkman EM, Heuser VD, Lintunen M, Ålgars A, Sundström J et al. Association of tumor-infiltrating T lymphocytes with intestinal-type gastric cancer molecular subtypes and outcome. *Virchows Arch.* 2021; 478(4):707-717. doi: 10.1007/s00428-020-02932-3.
35. Tashima Y, Kuwata T, Yoneda K, Hirai A, Mori M, Kanayama M et al. Prognostic impact of PD-L1 expression in correlation with neutrophil-to-lymphocyte ratio in squamous cell carcinoma of the lung. *Sci Rep.* 2020;10(1):1243. doi: 10.1038/s41598-019-57321-x
36. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chetien AS, Viens P, Sabatier R et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The first clinical evidences are emerging. A literature review. *Cancers (Basel).* 2019; 11(7):1033. doi: 10.3390/cancers11071033
37. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One.* 2013; 8:e82870. doi: 10.1371/journal.pone.0082870