

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
CONF. UNIV. DR. HABIL. CEAUȘU MIHAIL CONSTANTIN**

**Student-doctorand:
COSTACHE SIMONA**

ANUL 2024

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

**VARIABILITATEA HISTOTIPICĂ ȘI CONSTELAȚIA
IMUNOFENOTIPICĂ ȘI MOLECULARĂ ÎN
ADENOCARCINOMUL GASTRIC**

**Conducător de doctorat:
CONF. UNIV. DR. HABIL. CEAUȘU MIHAIL CONSTANTIN**

**Student-doctorand:
COSTACHE SIMONA**

ANUL 2024

Cuprins

Cuprins	i
Lista lucrărilor științifice publicate	iv
Lista cu simboluri și abrevieri	v
Introducere	1
I. Partea generală	4
1. Clasificări morfologice ale cancerului gastric	5
1.1. Clasificarea Laurén	6
1.2. Clasificarea Organizației Mondiale a Sănătății	9
2. Clasificări intrinseci și moleculare surogate ale cancerului gastric	15
2.1. Clasificarea The Cancer Genome Atlas	15
2.2. Clasificarea Asian Cancer Research Group	17
2.3. Clasificarea Singapore-Duke	19
2.4. Cadru de dezvoltare pentru clasificări moleculare	19
2.5. Clasificarea propusă de Setia <i>et al</i>	20
2.6. Clasificarea propusă de Ahn <i>et al</i>	22
2.7. Clasificarea propusă de Ramos <i>et al</i>	22
2.8. Clasificarea propusă de Zhao <i>et al</i>	24
2.9. Biomarkeri ce acompaniază diagnosticul („companion diagnostic” – CDx) utili în cancerul gastric	25
II. Contribuții personale	28
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	29
4. Metodologia generală a cercetării	32
4.1. Markerii și protocoale	34
4.2. Interpretarea markerilor imunohistochimici și de hibridizare in situ	35
5. Implementarea clasificării moleculare a cancerului gastric pe preparate histopatologice – un studiu cu micromatrice de țesut	37
5.1. Introducere	37
5.2. Material și metode	40
5.2.1. Pacienți și probe țesuturi	40
5.2.2. Micromatrice de țesut (TMA - „tissue microarray”)	41

5.2.2.1. Definiție și evoluție	41
5.2.2.2. Tehnica TMA	41
5.2.2.3. Avantajele utilizării	43
5.2.2.4. Dezavantajele utilizării	44
5.2.2.5. Prepararea TMA-urilor în cadrul studiului doctoral	46
5.2.3. Interpretarea biomarkerilor	49
5.2.4. Identificarea subtipurilor moleculare utilizând algoritmul ierarhic	49
5.2.5. Evaluarea clasificării Laurén	51
5.3. Rezultate	51
5.3.1. Caracterizarea lotului de pacienți	51
5.3.2. Clasificarea moleculară	54
5.3.3. Biomarkeri predictivi ce acompaniază diagnosticul („companion diagnostic” – CDx)	55
5.3.4. Analiză statistică corelativă	57
5.4. Discuții	87
5.4.1. Carcinom gastric asociat cu infecția cu virus Epstein Barr	87
5.4.2. Carcinom gastric cu deficiență pentru repararea împerecherii greșite – ”mismatch repair”	89
5.4.3. Carcinom gastric cu fenotip de tranziție epitelial-mezenchimală	90
5.4.3.1. Carcinomul gastric difuz ereditar	91
5.4.3.2. CLDN18.2	92
5.4.4. Carcinom gastric cu instabilitate cromozomială & Carcinom gastric cu genom stabil	101
5.4.5. Biomarkeri predictivi.....	102
5.5. Concluzii parțiale	104
6. Implementarea unei clasificării moleculare integrate pentru cancerul gastric pe preparate histopatologice utilizând biopsii prelevate endoscopic	105
6.1. Introducere	105
6.2. Material și metode	106
6.3. Rezultate	108
6.3.1. Studiul retrospectiv bazat pe material endoscopic	108

6.3.2. Studiul prospectiv bazat pe material endoscopic	108
6.3.3. Studiul cumulativ (retrospectiv și prospectiv) bazat pe material endoscopic	109
6.4. Discuții	112
6.4.1. Prevalența subgrupurilor moleculare	113
6.4.2. Considerații practice privind implementarea clasificării	113
6.4.3. Interpretarea imunohistochimică a markerului p53	115
6.5. Concluzii parțiale.....	117
7. Concluzii și contribuții personale.....	119
Bibliografie.....	123
Anexe.....	148

I. Problema fundamentală

Carcinomul gastric (CG) este o boală agresivă; mulți dintre pacienți sunt diagnosticați în stadii avansate, iar unii dintre aceștia sunt inoperabili [1,2]. Acesta este împărțit în mai multe subtipuri, iar incidența lor relativă este influențată de factori genetici și de mediu, astfel încât prevalența fiecărui subtip poate varia semnificativ în diferite populații [3]. Tratamentul convențional are un succes limitat [4–8]. Progresele recente în tratamentul personalizat îmbunătățesc rezultatele, dar, pentru ca acesta să fie eficient, trebuie să fie recunoscute subtipurile tumorale distincte. Numeroase clasificări au evidențiat diferite subtipuri morfologice și moleculare, dar în prezent nu se utilizează o clasificare unanimă.

Clasificarea CG în categorii de diagnostic care au la bază o terapie țintită ar putea duce în final la un tratament mai eficient [9]. Clasificările moleculare bazate pe next generation sequencing (NGS), cum ar fi cea propusă de către The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) [10] și Asian Cancer Research Group (ACRG) [11,12], au identificat o serie de subtipuri importante ale CG caracterizate prin semnături moleculare diferite, inclusiv un fenotip hipermutant asociat cu deficiență pentru repararea împerecherii greșite – „mismatch repair” (dMMR), un fenotip ultramutant cu instabilitate cromozomială (CIN) și un fenotip stabil din punct de vedere genomic (GS). În plus, este evident că există, totodată, o mică proporție de cazuri care au integrat genomul virusului Epstein-Barr (EBV).

Este recunoscut faptul că, deși există o oarecare suprapunere cu TCGA, o diferență majoră constă în faptul că ACRG nu are o categorie care să se bazeze exclusiv pe statusul EBV, în timp ce TCGA nu are o categorie care să se bazeze exclusiv pe statusul proteinei p53. Cu toate acestea, clasificările multiomice sunt dificil de pus în aplicare în rutina de diagnostic histopatologic. Din aceste considerente, mai multe grupuri de cercetători au încercat să identifice subtipuri de CG folosind un număr mic de teste direct pe lamele histopatologice de sticlă.

Grupul din Boston (Setia et al.) a fost primul care a propus o clasificare ierarhică folosind un număr mic de teste efectuate pe preparate histopatologice, care ar stratifica pacienții în categorii bazate pe semnături moleculare și asupra cărora se poate acționa clinic [13]. Mai recent, alte echipe de cercetare au folosit același portofoliu de teste efectuate pe lame cât și aceeași subclasificare. De exemplu, grupul coordonat de Ramos a demonstrat că o astfel de abordare este viabilă într-un studiu prospectiv [14]. Important de menționat este faptul că au

evidențiat dificultatea potențială de clasificare a tumorilor atunci când expresia celor patru markeri este heterogenă. Aceștia au ridicat problema eșantionării selective, recunoscând importanța interpretării corecte a profilelor mixte. Grupul condus de Ahn a testat o cohortă retrospectivă de pacienți cu CG folosind țesut cu micromatrice de ADN (TMA) și a arătat o corelație similară cu prognosticul. Zhao și colegii săi au folosit țesuturi arhivate în parafină, în TMA-uri colorate prin imunohistochimie (IHC) pentru proteinele mismatch repair - MMR (PMS2, MLH1, MSH2 și MSH6), E-cadherin și p21 pentru a clasifica CG în patru subtipuri, care se corelează cu prognostic diferit [16].

Toate aceste lucrări științifice demonstrează avantajele unei abordări ierarhice și arată un grad semnificativ de concordanță în ceea ce privește subtipurile de CG și biomarkerii utilizați. Cu toate acestea, nu există o clasificare unică adoptată pe scară largă. Trebuie ținut cont de faptul că s-a acordat puțină atenție diferențierii dintre subtipurile difuz și intestinal identificate de Laurén, clasificare care rămâne o piatră de temelie în luarea deciziilor de tratament [17].

În prezent, există o serie de clasificări ale CG bazate pe diferite teste. Unele dintre grupurile de diagnostic se suprapun în mod considerabil, dar acest lucru nu este întotdeauna clar, deoarece se utilizează o terminologie diferită și, uneori și markeri diferiți.

Studiul pe care l-am efectuat în cadrul cercetării doctorale are o primă *parte generală* ce conține clasificările actuale bazate pe morfologie propuse de Laurén, precum și clasificarea Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), urmată de prezentarea celor mai cunoscute clasificări intrinseci/moleculare elaborate de TCGA, ACRG și grupul Singapore-Duke cât și a celor de substituție propuse de Setia *et al.*, Ramos *et al.*, Ahn *et al.* și Zhao *et al.*

Cea de-a doua parte a tezei este dedicată *secțiunii speciale* în care am definit ipoteza de lucru, obiectivele cercetării, materialele și metodele utilizate, urmată de rezultatele pe care le-am obținut și de discuții. Ultima parte a studiului doctoral conține *concluziile finale și contribuțiile personale* care evidențiază importanța implementării unei clasificări moleculare intrinseci bazată pe aspectul obținut pe lamele de sticlă cu preparate histopatologice ale CG și necesitatea existenței unei astfel de clasificări.

II. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării

Lipsa de armonizare între toate clasificările existente, complexitatea și indisponibilitatea unora dintre testele necesare, precum și solicitările de timp și resurse, contribuie la o slabă implementare în rutina de diagnostic [17]. Din acest motiv, am propus modificări [18], inclusiv în ceea ce privește armonizarea nomenclurii și a biomarkerilor utilizați, introducerea unei categorii nedeterminate de CG, adăugarea biomarkerilor oncologici predictivi necesari în prezent pentru selectarea terapiei și posibilitatea ulterioară de a include noi biomarkeri care, în mod inevitabil, vor deveni obligatorii [19]. Adăugarea unei categorii nedeterminate de CG a făcut parte din implementarea cu succes a noii clasificări moleculare pentru carcinomul endometrial [20–22] și considerăm că este un element important pentru implementarea clinică eficientă a CG.

Pentru a identifica avantajele și dezavantajele clasificării propuse în cadrul cercetării doctorale, au fost concepute și conduse, în succesiune, 3 studii:

- în primul studiu, pentru a confirma că implementarea acestei clasificări este fezabilă în practica curentă a laboratorului de Anatomie Patologică, am folosit un lot de pacienți care au beneficiat de rezechii pentru CG și am realizat un studiu retrospectiv prin construirea unor blocuri de parafină cu țesut cu micromatrice de ADN (TMA- „tissue microarray”); ulterior am evaluat biomarkerii utilizați și fiecare caz a fost încadrat într-un subtip molecular specific [23];
- în al doilea studiu, am validat încadrarea în subtipuri moleculare specifice printr-un studiu retrospectiv, realizat pe un lot mic de biopsii de CG prelevate endoscopic;
- în al treilea studiu, am validat încadrarea în subtipuri moleculare specifice printr-un studiu prospectiv, realizat pe un lot mic de biopsii de CG prelevate endoscopic.

Este important de menționat faptul că, pentru o proporție semnificativă de pacienți diagnosticați cu CG, singurul țesut disponibil este reprezentat de biopsiile prelevate endoscopic, deoarece respectivii nu vor fi eligibili pentru rezechia chirurgicală completă (stadiu avansat al bolii sau status de performanță precar / comorbidități multiple).

Biopsiile prelevate endoscopic prezintă multiple provocări – de exemplu identificarea componentei invazive față de displazia de grad înalt („high grade” - HG), cantitățile limitate de țesut și posibilitatea de a evalua heterogenitatea. În plus, biopsia endoscopică este adesea o probă

superficială de mucoasă, cu un micromediu tumoral diferit de cel al cancerului invaziv, sau din porțiuni mai profunde ale peretelui gastric sau esofagian.

În încercarea de a „reproduce” cantitatea mică de țesut biopsiat, primul nostru studiu a fost realizat prin folosirea tehnicii TMA. Suntem conștienți de faptul că nucleeele TMA au fost alese din zonele cele mai reprezentative ale tumorii, iar acestea nu conțin zone cu mucoasă normală. Prin urmare, în cel de al doilea și, respectiv, al treilea studiu am testat aplicabilitatea clasificării folosind biopsii prelevate endoscopic, cu toate limitările intrinseci ale acestor probe. Inițial, am testat retrospectiv un set de biopsii endoscopice din arhiva serviciului de Anatomie Patologică. Ulterior, am evaluat provocările pe care le ridică punerea în aplicare a acestei clasificări în mod prospectiv, folosind biopsii endoscopice consecutive, din diagnosticul de rutină.

III. Metodologia generală a cercetării

Baza de date a cercetării a fost alcătuită din pacienții care s-au prezentat la Spitalul Universitar de Urgență din București (SUUB) pentru o formațiune tumorală malignă gastrică.

- Pentru primul studiu au fost incluși pacienții adulți (≥ 18 ani) ce au fost supuși operației de gastrectomie totală sau subtotală, având diagnosticul de adenocarcinom (ADK), în perioada 2013-2020, alcătuind astfel studiul retrospectiv.
- Pentru al doilea studiu am inclus pacienți ce au fost supuși endoscopiei digestive superioare (EDS), în urma căreia s-au prelevat biopsii și a fost stabilit diagnosticul histopatologic de ADK. Aceștia au fost incluși într-un studiu retrospectiv, biopsiile fiind prelevate în anul 2013.
- Al treilea studiu a inclus un lot mic de pacienți consecutivi, care au efectuat EDS în anul 2023; au fost prelevate biopsii ce au fost diagnosticate ulterior ca și ADK; astfel, s-a efectuat un studiu prospectiv.

Pentru fiecare studiu am realizat o bază de date în Microsoft Excel (variante Microsoft 365 Office Home) urmărind următoarele variabile: date demografice (vârstă, gen), localizarea tumorii și subtipul histopatologic al acesteia (conform clasificării OMS, ediția 5-a, 2019 și subtipului Laurén). Pentru studiul retrospectiv efectuat pe rezecțiile chirurgicale am inclus și alte aspecte precum: dimensiunea tumorii, limitele de rezecție, grading-ul tumoral, prezența invaziei limfovaskulare cât și a celei perineurale și stadializarea tumorală, utilizând cea mai recentă ediție (a 8-a) a Asociației Americane a Cancerului (AJCC).

Din arhiva Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al SUUB au fost selectate preparatele histopatologice și blocurile de parafină corespunzătoare pacienților incluși în cele două studii retrospective. Toate lamele histopatologice colorate cu hematoxină-eozină (H&E) ale pacienților selectați au fost analizate și reevaluate. Acestea au fost digitalizate utilizând scannerul 3D-Histech PANNORAMIC 1000 (P1000) cu o putere de magnificare primară de x36. Ulterior, acestea au fost vizualizate utilizând CaseViewer v2.6 pe monitoare cu rezoluție 4K.

Pentru realizarea primului studiu am ales o lamă reprezentativă din fiecare caz, aceasta a fost digitalizată, s-au creat două adnotații aferente, iar apoi s-au construit TMA-urile cu ajutorul TMA-Grandmaster. Blocurile de parafină astfel obținute au fost ulterior secționare cu ajutorul microtomului și am realizat colorații H&E, IHC și In Situ Hybridization (ISH).

Markerii utilizați în toate cele trei studii au fost: EBER, proteinele MMR (MLH-1 și MSH-2), E-cadherin, β -catenin, p53, Her2, DDISH, PD-L1 (22C3) și Claudin18.2. Pentru cele două studii realizate pe biopsii prelevate endoscopic am adăugat și celelalte două proteine MMR (PMS-2 și MSH-6). Pentru Her2, IHC, am folosit sistemul de detecție UltraView DAB.

Digitalizarea, efectuarea TMA-urilor, a tuturor testelor IHC și ISH cât și vizualizarea acestora au fost realizate în cadrul Pounbury Cancer Institute (PCI), Dorchester, UK, cu acordul și prin amabilitatea Dr. Corrado D'Arrigo, director al PCI și a echipei aferente.

Toate datele obținute au fost introduse în baza de date Microsoft Excel realizată inițial, completând informația aferentă fiecărui pacient. Prelucrarea statistică a datelor a fost realizată cu ajutorul softului oferit de Microsoft Excel, dar și a programului R, versiunea 4.4.0 (Copyright (C) 2024 The R Foundation for Statistical Computing, R Core Team (2024). R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria), folosind următoarele pachete suplimentare: cluster și gtsummary. Alte teste statistice pe care le-am utilizat sunt: testul Fisher's exact, testul ANOVA (one-way analysis of variance)/ regresia liniară, AIC (Akaike information criterion), BIC (Bayesian information criterion), log-likelihood, chi-square goodness of fit cât și analiza LCA (latent class analysis) bayesiană.

IV. Partea specială – sinteza capitolelor

Capitolul 5 este dedicat primului studiu retrospectiv realizat pe specimene de rezecție de CG. Am definit mai întâi (*subcapitolul 5.1*) clasificarea moleculară pe care am propus-o, ce conține șase subtipuri de CG: CG-EBV (CG asociat cu virusul Epstein-Barr), CG-dMMR (CG asociat cu MMR deficient), CG-EMT (CG asociat cu tranziția epitelial-mezenchimală), CG-CIN (CG cu instabilitate cromozomială), CG-GS (CG stabil din punct de vedere genomic) și CG-NOS (CG- nedeterminat). Clasificarea a fost fundamentată prin folosirea EBV-ISH, statusul MMR prin IHC, E-cadherin și β -catenin IHC și p53 IHC, toate acestea fiind teste care pot fi furnizate în majoritatea laboratoarelor de Histopatologie. Clasificarea prezintă o abordare ierarhică pentru a stabili fiecare subtip molecular. După identificarea CG EBV pozitive, dMMR și EMT, utilizarea anticorpului p53 separă tumorile CIN de cele tumorile GS (figura 1).

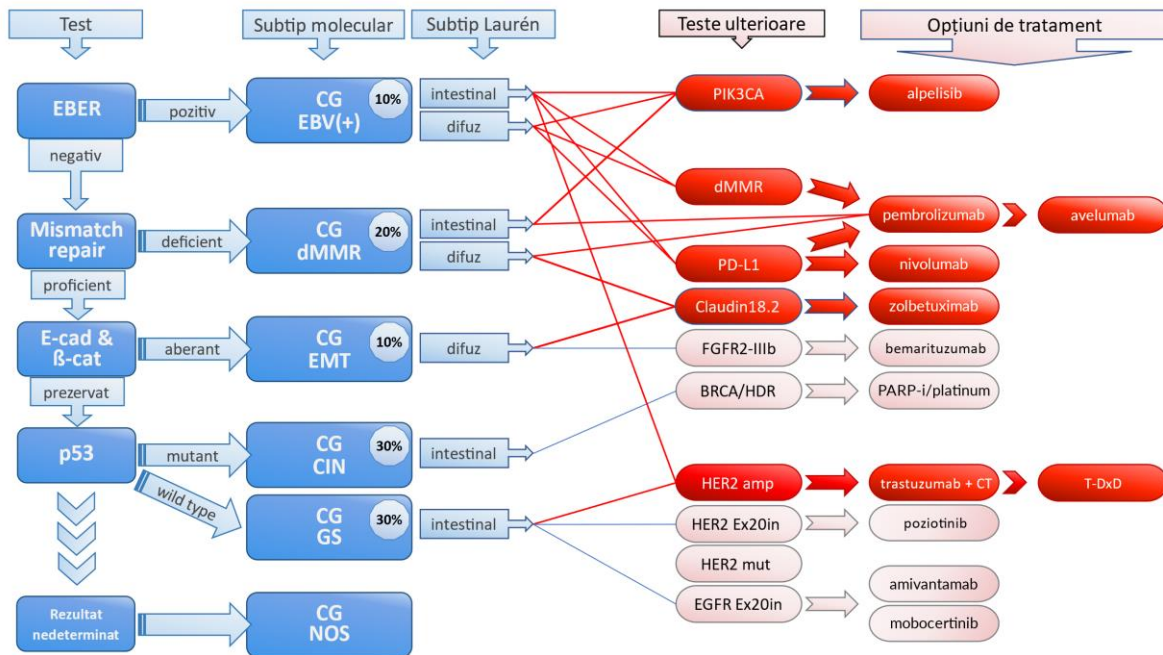


Figura 1. Clasificarea moleculară propusă

Pentru a confirma avantajele și dezavantajele clasificării propuse trebuie validat dacă implementarea acesteia este fezabilă în practica curentă a laboratorului de Anatomie Patologică, trebuie descrisă interpretarea fiecărui biomarker utilizat cât și algoritmul ierarhic (acest lucru a

fost realizat în *subcapitolele 5.1 și 5.2*). Astfel, am folosit un lot de pacienți care au beneficiat de rezecții pentru CG într-un studiu retrospectiv și am construit blocuri de parafină cu țesut cu micromatrice de ADN (TMA). Ulterior, am evaluat biomarkerii și fiecare caz a fost încadrat într-un subtip molecular. Am demonstrat, de asemenea, că pentru un TAT (timp de răspuns) mai bun și mai puțină muncă pentru personalul din laborator, o abordare care constă în efectuarea în avans a tuturor testelor necesare este mai bună decât abordarea tradițională "pas cu pas". Un prim nivel de biomarkeri efectuați pe preparatele histopatologice trebuie să furnizeze date legate de prognostic și să ghideze recomandarea pentru un al doilea nivel de biomarkeri predictivi pentru terapie (Figura 2).

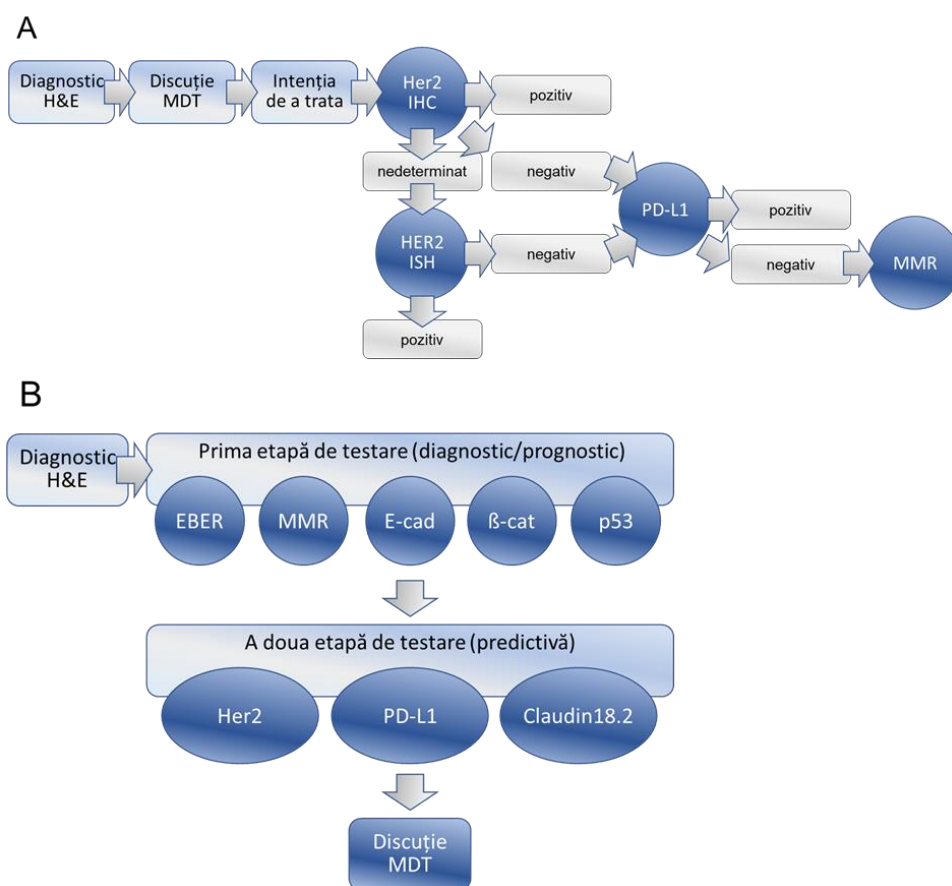


Figura 2. **A.** Fluxul de lucru actual, obligatoriu, al laboratorului; TAT lent.

Abordarea actuală, „pas cu pas” utilizată frecvent, va duce la un TAT lent din cauza necesității de a interpreta fiecare test înainte de a-l comanda pe următorul. **B.** Flux de lucru al laboratorului, modificat, TAT rapid. După diagnosticul histologic de CG, toate testele de prim nivel sunt solicitate în același timp; tumorile sunt clasificate utilizând abordarea ierarhică; testele din a doua etapă sunt necesare pentru a prezice răspunsul la tratamente specifice. Utilizând această abordare și pentru alte tipuri de

tumori, suntem capabili să raportăm în mod obișnuit aceste seturi de date cu un TAT de două până la patru zile. H&E = hematoxilină și eozină; MDT = echipă multidisciplinară; EBER = ISH pentru ARN-uri mici codificate de EBV; E-cad = E-cadherin; β -cat = beta-catenin.

În subcapitolele următoare (5.2.1. și 5.2.2.) am descris lotul pe care l-am folosit, corespunzător la 79 piese de rezecție chirurgicală de la pacienți cu CG, definiția și evoluția TMA, tehnica acesteia, precum și avantajele și dezavantajele utilizării unui astfel de echipament. În timpul fazei de planificare și proiectare a ngTMA, au fost stabilite următoarele reguli: de la fiecare pacient va fi investigată regiunea histologică reprezentativă, ținând pentru centrul tumoral invaziv; două spoturi tumorale pentru fiecare pacient vor fi incluse în blocul TMA. Pentru ca nucleul de TMA să fie reprezentativ, iar biomarkerii să poată fi interpretați cu ușurință, am ales un diametru al carotei de 1,5 mm pentru construirea TMA, pentru toate blocurile. Pentru proiectarea acestui TMA, am ales o distanță confortabilă de 0,4 mm între nuclee. Astfel, un bloc ngTMA a conținut 32 de biopsii tumorale (nuclee). Pentru orientarea acestora am utilizat două biopsii de referință dintr-un parenchim hepatic și un spațiu gol, iar fiecare formațiune tumorală a fost eșantionată dublu. În concluzie, au fost realizate cinci blocuri ngTMA, cu ajutorul TMA-Grand Master (Figura 3).

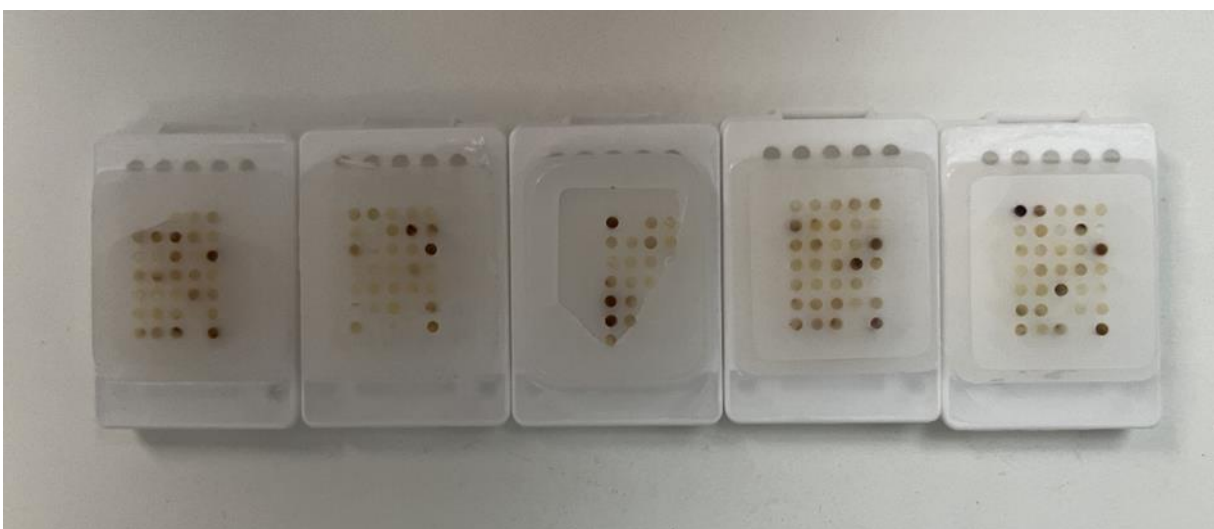


Figura 3. Blocurile TMA efectuate

Ulterior blocurile de parafină au fost secționare și s-au realizat preparate histopatologice pentru colorația H&E, pentru IHC, cât și pentru ISH. Preparatele histopatologice colorate H&E, rezultate prin secționarea blocurilor TMA de parafină, au fost comparate cu secțiunile H&E originale obținute din tumora excizată chirurgical, pentru a valida bibliotecile TMA (Figura 4).

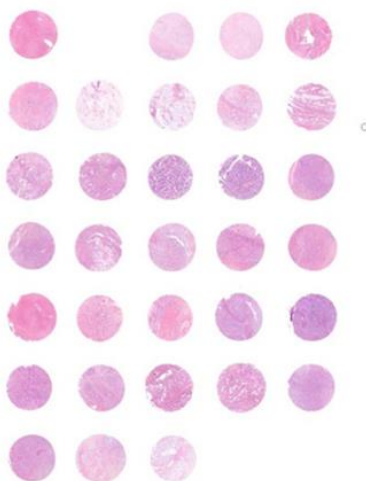


Figura 4. Lamă TMA digitalizată; H&E, 0.5x.

În *capitolul 5.2.4* am identificat subtipurile moleculare utilizând algoritmul ierarhic. Inițial, a fost evaluat statusul EBER, iar dacă acesta este pozitiv, cazul este clasificat ca și CG EBV (+); toate CG EBER negative sunt apoi evaluate pentru statusul MMR, iar dacă acesta este deficient, formațiunea tumorală este atribuită categoriei CG-dMMR.

Toate cazurile MMR pozitive („proficient”) și EBER negative sunt evaluate pentru prezența sau absența expresiei E-cadherin și β -catenin; dacă se identifică o expresie aberantă, cazul este încadrat în CG-EMT.

În final, se evaluează statusul p53 pentru toate cazurile unde există prezervarea colorației E-cadherin și β -catenin, sunt MMR „proficient” și EBER este negativ; cazurile care prezintă un pattern p53m sunt clasificate ca și CG-CIN, pe când cele cu pattern „wild-type” sunt încadrate în subtipul CG-GS (Figura 5).

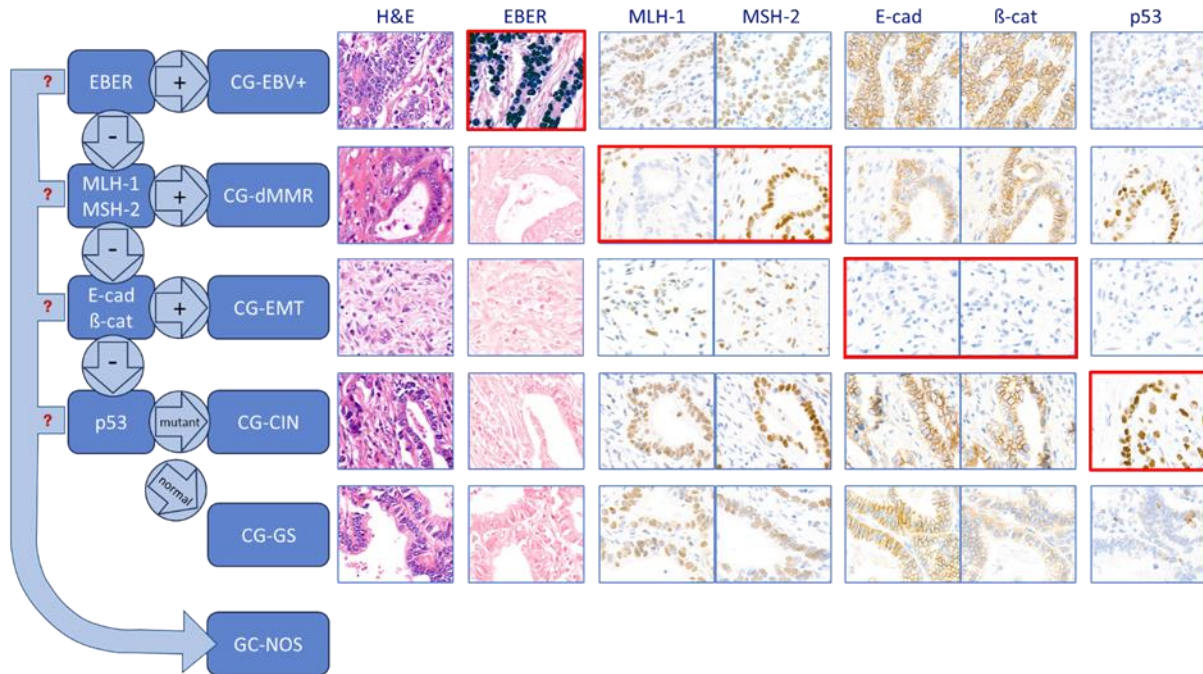


Figura 5. Clasificarea ierarhică

De asemenea, am evaluat prevalența fiecărui subgrup împreună cu biomarkerii predictivi pe care i-am folosit (Her2, PD-L1 și Claudin18.2). În continuare, în *subcapitolul 5.3.4* am efectuat o analiză statistică corelativă asupra lotului studiat. În *subcapitolul 5.4* ne-am concentrat asupra discuțiilor despre acest prim studiu, în care scopul nostru principal a fost de a defini parametrii, precum și algoritmul de interpretare pentru fiecare biomarker utilizat și de a identifica provocările în evaluarea acestora. Prin urmare, am utilizat țesut tumoral provenit din rezecții chirurgicale de CG, realizând un lot de 79 de pacienți, construind apoi blocuri de parafină cu TMA. De asemenea, am urmărit determinarea proporției relative a fiecărei categorii moleculare și asocierea cu subtipul Laurén, precum și cu biomarkerii predictivi utilizați în tratamentul pacienților cu CG. Constatările au fost discutate în detaliu, cu accent pe Claudin18.2, care este un nou biomarker emergent, aflat în studii clinice într-un stadiu avansat, fiind o țintă pentru imunoterapie care pare a fi foarte eficientă în CG difuz.

Următorul pas în cercetarea doctorală a fost identificarea fezabilității implementării acestei clasificări ierarhice în diagnosticul de rutină folosind biopsii prelevate endoscopic. Acest lucru a fost detaliat în *capitolul 6*. Prin urmare, brațul retrospectiv al acestui studiu a utilizat 24 de cazuri consecutive de ADK gastric sau de jonctiune gastro-esofagiană (OGJ) din biopsii endoscopice prelevate în anul 2013 pentru care am avut blocuri de parafină (FFPE), cu suficient

țesut pentru a permite realizarea unor noi secțiuni. Brațul prospectiv al studiului a utilizat 30 de biopsii endoscopice consecutive de ADK gastric sau OGJ confirmat în cadrul rutinei de diagnostic histopatologic, prelevate între lunile mai - noiembrie 2023.

Biomarkerii utilizați și tehnicile au fost identice cu cele utilizate în primul studiu (pe specimene de rezecție chirurgicală), cu excepția blocurilor realizate prin TMA (Figura 6). Cele două studii endoscopice au fost descrise separat, dar și combinat.

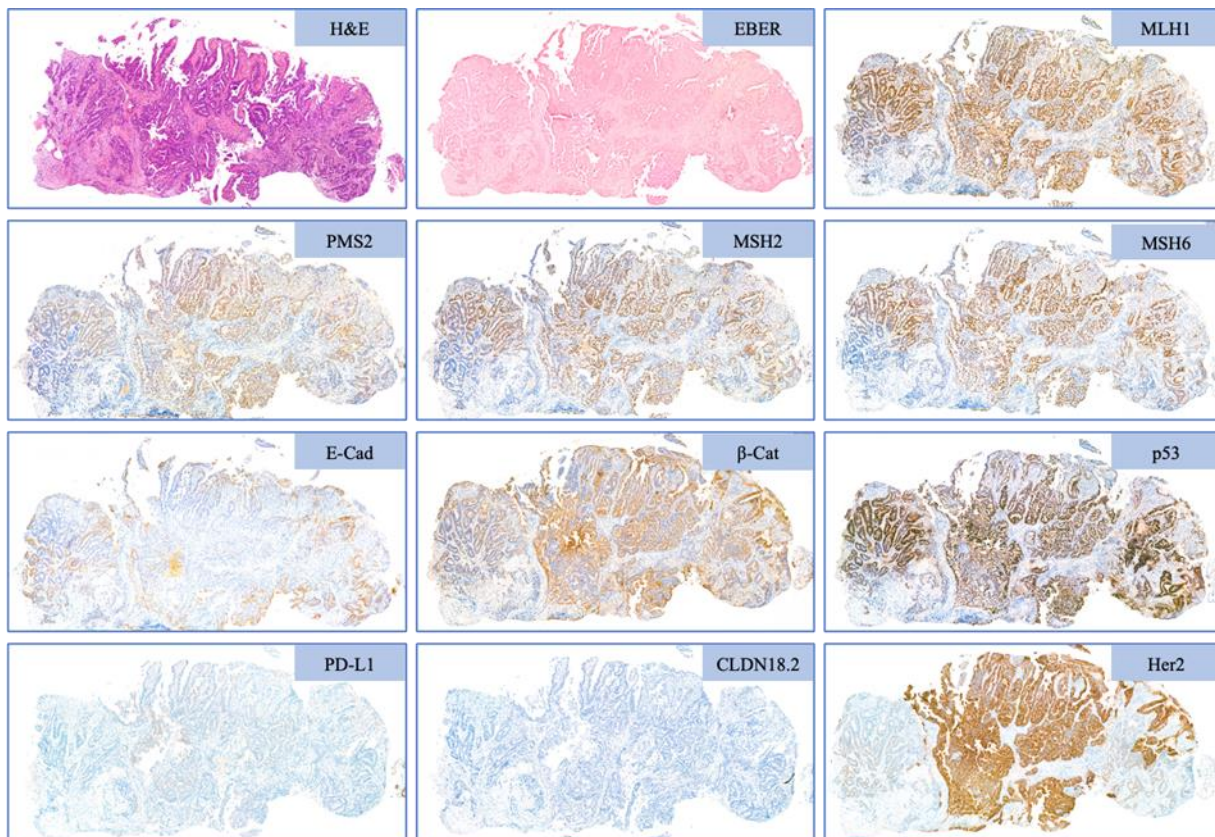


Figura 6. Exemplu de evaluare al biomarkerilor pentru clasificarea moleculară. Cazul 2 din cohorta retrospectivă. Diagnostic final: CG-CIN, tip Laurén intestinal. H&E arată tipul intestinal Laurén; ISH pentru EBER este negativ; IHC pentru enzimele MMR (MLH1, PMS2, MSH2 și MSH6) arată o expresie conservată la nivel nuclear; IHC pentru E-cadherin și β -catenin arată o colorare conservată a membranei; IHC pentru p53 arată o colorare puternică și difuză a nucleilor în ≥ 80 din celulele tumorale (p53m). Biomarkeri CDx suplimentari: PD-L1 este negativ (CPS < 5), Claudin18.2 este negativ (fără colorare membranară) și Her2 este pozitiv (scor IHC 3+). Toate microfotografiile au fost realizate la o mărire digitală de 3,5x.

În următoarele subcapitole (6.3 și 6.4) am interpretat rezultatele studiului endoscopic și ne-am concentrat pe evaluarea p53 IHC, deoarece acesta este un marker dificil, iar interpretarea corectă a fiecărui biomarker este esențială pentru implementarea cu succes a acestei clasificări (Figura 7). În secțiunea 6.5 a capitolului am concluzionat că această clasificare de lucru realizată doar pe lame histopatologice (de sticlă) poate fi utilizată pe biopsii prelevate endoscopic, care au dimensiuni mici, necesită o modificare minoră a căilor actuale în vederea parcursului unei probe biopsice în cadrul laboratorului de Anatomie Patologică și poate fi livrată cu un TAT scurt, corespunzând cerințelor pacienților cu cancer.

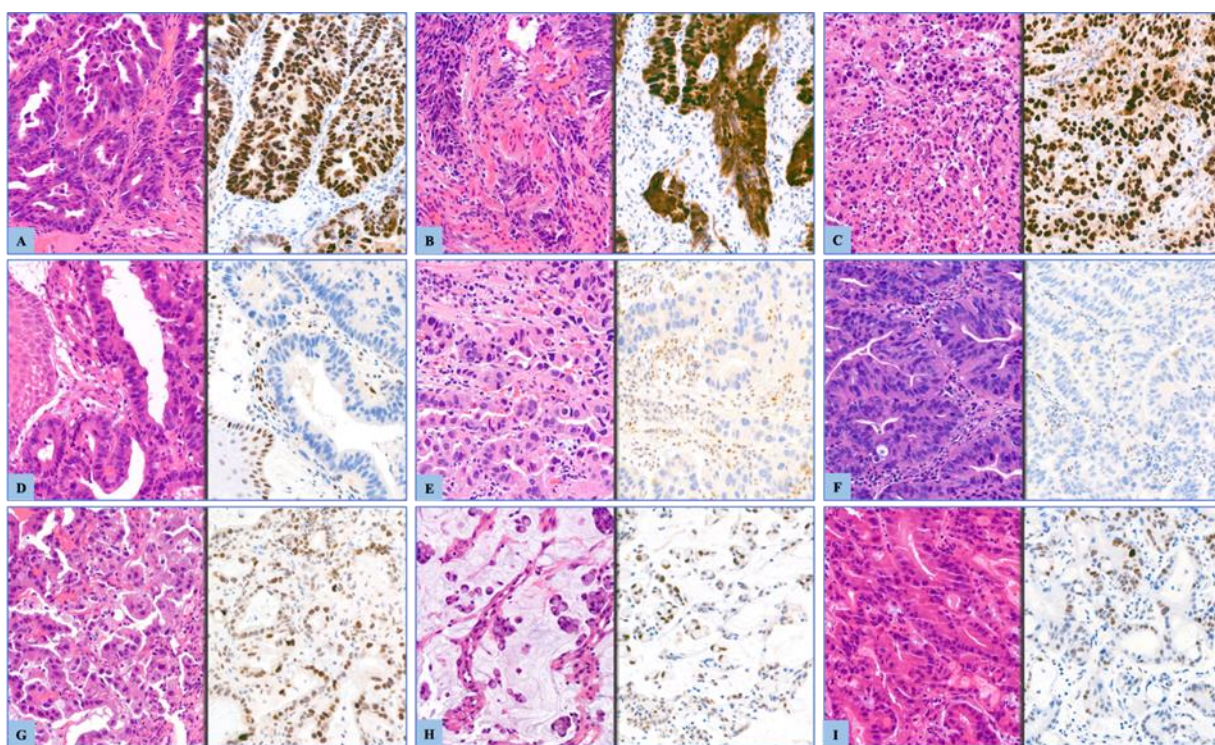


Figura 7. Modele de colorare IHC a p53; H&E și p53 IHC perechi. Rândul de sus (A-C): Model IHC p53m supraexprimat (colorare nucleară puternică și difuză în $\geq 80\%$ din celulele tumorale); rândul din mijloc (D-F): Model IHC p53m nul (nicio colorare în celulele tumorale); rândul de jos (G-I): model p53wt (colorare nucleară de intensitate variabilă în $\geq 1\%$ din celulele tumorale). Toate microfotografiile au fost realizate la o mărire digitală de 20x.

V. Concluzii și contribuții personale

1. Cercetarea doctorală a evidențiat necesitatea de a propune o clasificare moleculară universal valabilă pentru CG, care să fie ușor de implementat și care să poată fi realizată cu ajutorul instrumentelor existente în orice laborator de Anatomie Patologică.
2. Adevăratele clasificări moleculare rămân disponibile doar pentru o minoritate de pacienți cu CG, deoarece necesită o genomică și o transcriptomică cuprinzătoare, cu costuri ridicate, pentru care există o lipsă evidentă de capacitate, la nivel mondial.
3. Mai multe grupuri de cercetători au încercat să ofere o clasificare moleculară bazată pe un număr mic de markeri (Setia et al., Ramos et al., Ahn et al., Zhao et al.), însă au utilizat nomenclatură diferită și adesea, teste diferite sau algoritmi de interpretare diferiți. Prin urmare, a fost nevoie de o armonizare a terminologiei, a repertoriului de teste și a interpretării acestora.
4. Am propus o clasificare de lucru incluzivă bazată pe teste ce pot fi efectuate pe preparatele histopatologice folosind resursele disponibile în prezent în majoritatea laboratoarelor de Histopatologie.
5. Clasificarea CG include determinarea subtipurilor Laurén folosind secțiuni colorate cu H&E și statusul a șase biomarkeri pe preparate histopatologice (EBER, MLH-1, MSH-2, E-cadherin, β -catenin și p53) folosind ISH și IHC.
6. Am folosit un lot de 79 de pacienți cu rezecție chirurgicală pentru CG pentru a verifica fezabilitatea implementării acesteia și de a distribui cazul în una dintre cele 6 categorii: CG asociat cu virusul Epstein-Barr (CG-EBV), CG cu deficiență pentru repararea împerecherii greșite – „mismatch repair” (CG-dMMR), CG cu tranziție epitelial-mezenchimală (CG-EMT), CG cu instabilitate cromozomială (CG-CIN), CG stabil din punct de vedere genomic (CG-GS) și CG-NOS/nedeterminat.
7. Am evaluat, de asemenea, posibilitatea integrării în această clasificare a unui număr de teste predictive de diagnostic companion (CDx) efectuate pe preparate histopatologice, necesare pentru gestionarea pacienților cu CG. Acestea au inclus Her2, PD-L1 și Claudin18.2.
8. Utilizarea anticorpului p53 separă tumorile CIN de tumorile GS. Pentru această separare pot fi utilizați și alți biomarkeri, cum ar fi p21.
9. Considerăm că alegerea nomenclaturii pentru CIN și GS reprezintă o îmbunătățire, în sensul că armonizează cercetarea în cadrul CG, așa cum s-a întâmplat și în alte organe.

10. Pentru a identifica cazurile de CG-EMT, am utilizat β -catenin în plus față de E-cadherin. Alți autori, care au încercat clasificarea moleculară a CG cu ajutorul biomarkerilor pe preparate histopatologice au limitat testarea doar la E-cadherin.
11. Am introdus categoria CG-NOS pentru acele cazuri în care un biomarker din aval al unei tumori încă neclasificate nu a putut fi interpretat (rezultat nedeterminat); atunci cazul a fost plasat în categoria nedeterminată (CG-NOS).
12. Am utilizat o abordare ierarhică pentru atribuirea subtipurilor specifice, având drept ghid publicațiile anterioare, precum și clasificarea ierarhică deja recunoscută a cancerului endometrial.
13. Cu această abordare ierarhică, odată ce o tumoră este încadrată într-o subgrupă moleculară, biomarkerii din aval nu mai contribuie la scopul clasificării.
14. Am explicat și exemplificat în detaliu algoritmul pe care l-am utilizat.
15. Am definit toți parametrii folosiți, luând în considerare cele mai recente publicații și ghiduri de interpretare acceptate de ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology și College of American Pathologists), NICE (National Institute for Health and Care Excellence) și EMA (European Medicines Agency).
16. În același timp, ținând cont de faptul că această clasificare pe care am propus-o se dorește a fi un „schelet” la care pot fi adăugați oricând alți biomarkeri, ca dovadă de concept am folosit Her2, PD-L1 și Claudin18.2.
17. În primul studiu, retrospectiv, am utilizat un lot de 79 de pacienți dintr-o singură unitate spitalicească (SUUB) care au fost supuși intervenției chirurgicale - gastrectomie totală sau parțială, în perioada 2013 - 2020.
18. Au fost selectate blocuri FFPE corespunzătoare cazurilor și cu ajutorul instrumentului TMA-GrandMaster am realizat 5 blocuri primitoare cu nucleu TMA. Acestea au fost secționare la microtom și ulterior colorate cupele histopatologice cu markerii specificați.
19. Toate lamele obținute au fost digitalizate folosind P1000 produs de 3D-Histech Ltd. cu o mărire inițială de 36x și apoi vizualizate pe ecrane cu rezoluție 4K.
20. Producerea TMA, colorarea cu markeri IHC și ISH, digitalizarea și interpretarea lamelelor au fost realizate la Poundbury Cancer Institute (PCI), Dorchester, Marea Britanie, cu acordul și prin amabilitatea Dr. Corrado D'Arrigo, directorul PCI și a echipei sale.

21. Rezultatele pe care le-am obținut au fost similare cu cele existente în literatura de specialitate publicată.
22. Am efectuat o analiză statistică amplă asupra lotului de 79 de specimene de rezecție chirurgicală pentru CG.
23. Am demonstrat că markerii aleși sunt cei adecvați pentru a descrie fiecare grup molecular.
24. Am demonstrat că această clasificare este o metodă ieftină și eficientă, care poate fi utilizată de către medicii anatomo-patologi pentru a oferi informații prognostice, precum și pentru a identifica tratamentul țintit.
25. În viitorul apropiat vor fi necesari și alți biomarkeri predictivi, astfel încât clasificarea pe care am propus-o să poată oferi informații pentru a prioritiza biomarkerii necesari pentru testele de diagnostic complementare.
26. Am propus o clasificare moleculară de lucru incluzivă bazată pe teste efectuate pe preparate histopatologice, care asigură armonizarea și poate fi realizată folosind resursele existente în majoritatea laboratoarelor de Histopatologie, însă acest studiu a lăsat o serie de întrebări fără răspuns. De exemplu, biopsiile endoscopice vor conține suficient țesut pentru clasificarea propusă? Condițiile preanalitice vor avea un impact asupra interpretării testului? Cât de ușoară este evaluarea biomarkerilor pe eșantioane mici și superficiale de CG?
27. Astfel de întrebări sunt pertinente, întrucât biopsia endoscopică este singurul țesut tumoral disponibil pentru o proporție semnificativă de pacienți cu CG.
28. În încercarea de a reproduce cantitatea mică de țesut din biopsie - studiul anterior a utilizat TMA, dar suntem conștienți de faptul că nucleeele TMA au fost alese din zonele cele mai reprezentative ale tumorii și nu conțineau mucoasă normală.
29. Prin urmare, în celelalte două studii am dorit să înțelegem dacă această clasificare poate fi realizată folosind biopsiile prelevate endoscopic, cu toate limitările inerente acestor probe. Am utilizat două loturi diferite de pacienți cu CG diagnosticați prin biopsiere endoscopică. Lotul retrospectiv a inclus 24 de cazuri din arhiva laboratorului, consecutive, de ADK gastric sau OGJ de la care am avut blocuri (FFPE) cu dimensiuni suficiente ale țesutului inclus pentru a permite tăierea de noi secțiuni, efectuate în 2013. Lotul prospectiv a cuprins 30 de pacienți consecutivi cu ADK gastric sau OGJ confirmați prin biopsie prelevată endoscopic în rutina de diagnostic, între lunile mai - noiembrie 2023.

30. Fiecare caz a fost adnotat pentru a se verifica prezența unui materialului suficient pentru diagnostic și pentru a se stabili timpul de răspuns (TAT). Cazurile discordante au fost analizate în cadrul unei conferințe medicale și s-a ajuns la un diagnostic de consens.
31. A fost efectuat un studiu de timp și mișcare pentru a oferi o indicație cu privire la resursele suplimentare necesare pentru a evalua toți biomarkerii și pentru a oferi o clasificare finală. Acest lucru a fost realizat prin măsurarea timpului necesar unui medic anatomo-patolog pentru a examina un caz care fusese diagnosticat anterior ca fiind carcinom și pentru care toți biomarkerii suplimentari au fost pregătiți, iar preparatele histopatologice digitalizate.
32. Executarea în timp util a clasificării propuse de noi a necesitat coordonarea cu personalul din laborator.
33. Toate secțiunile necesare au fost tăiate în avans, după stabilirea diagnosticului de CG invaziv. Am constatat că 16 secțiuni de rezervă au fost suficiente. Am avut un singur caz (dintr-un total de 54) în care țesutul a fost epuizat și un singur test nu a putut fi efectuat (Claudin18.2).
34. Am demonstrat că, în timp ce o abordare „pas cu pas” ar economisi costurile reactivilor, ar crește timpul atât pentru tehnicieni, cât și pentru medicii anatomo-patologi și, în cele din urmă, ar fi mai costisitoare pentru serviciu; prin urmare, planificarea tuturor testelor în avans permite personalului din laborator să optimizeze utilizarea imunostainerelor și să minimizeze impactul asupra capacității, creând, în mod paradoxal, chiar mai multă capacitate.
35. Interpretarea corectă a tuturor testelor pe lame histopatologice este esențială pentru implementarea cu succes a acestei clasificări.
36. Există un consens în ceea ce privește acordarea unui scor și interpretarea tuturor biomarkerilor pe care i-am utilizat în studiu, cu excepția p53. De aceea, am subliniat importanța acestui marker și modul în care interpretarea sa ar trebui să fie mai precisă.
37. Am concluzionat că această clasificare de lucru efectuată pe lame histopatologice poate fi utilizată și în cadrul biopsiilor endoscopice, necesită o modificare minoră asupra căilor tisulare existente și poate fi livrată cu un TAT scurt, corespunzând cerințelor pacienților cu CG.
38. Marea limitare a acestui studiu este lipsa rezultatelor supraviețuirii și a efectelor post-tratament.
39. Sunt necesare studii viitoare care să se axeze pe relația dintre clasificarea pe care am propus-o, ce are potențialul de a fi implementată în diagnosticul de rutină în orice laborator de

Anatomie Patologică și rezultatele tratamentului, efectele acestuia cât și corelarea cu supraviețuirea pacienților.

40. Considerăm că această clasificare este necesară în practica uzuală de diagnostic, studiul doctoral fiind un prim pas în vederea promovării implementării acesteia la nivel internațional. Totodată, cu ajutorul microscopiei digitale putem realiza o bibliotecă virtuală și în final se pot efectua studii de largă amplitudine, inter-instituționale.

Bibliografie selectivă

1. Johnston FM, Beckman M. Updates on Management of Gastric Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2019 Aug;21(8):67.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
3. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *pg.* 2019;14(1):26–38.
4. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Upper GI and Pancreatic Diseases Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet].* 2017 Aug 29 [cited 2023 May 20];2017(8). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004064.pub4>
5. Park SR, Chun JH, Kim YW, Lee JH, Choi IJ, Kim CG, et al. Phase II Study of Low-Dose Docetaxel/Fluorouracil/Cisplatin in Metastatic Gastric Carcinoma: *American Journal of Clinical Oncology.* 2005 Oct;28(5):433–8.
6. Sun DS, Jeon EK, Won HS, Park JC, Shim BY, Park SY, et al. Outcomes in elderly patients treated with a single-agent or combination regimen as first-line chemotherapy for recurrent or metastatic gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2015 Jul;18(3):644–52.
7. Narahara H, Iishi H, Imamura H, Tsuburaya A, Chin K, Imamoto H, et al. Randomized phase III study comparing the efficacy and safety of irinotecan plus S-1 with S-1 alone as first-line treatment for advanced gastric cancer (study GC0301/TOP-002). *Gastric Cancer.* 2011 Mar;14(1):72–80.
8. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van De Velde CJH, Nicolson M, et al. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):11–20.
9. Ichikawa H, Nagahashi M, Shimada Y, Hanyu T, Ishikawa T, Kameyama H, et al. Actionable gene-based classification toward precision medicine in gastric cancer. *Genome Med.* 2017 Dec;9(1):93.
10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014 Sep 11;513(7517):202–9.
11. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015 May;21(5):449–56.

12. Wong SS, Kim KM, Ting JC, Yu K, Fu J, Liu S, et al. Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 2014 Nov 19;5(1):5477.
13. Setia N, Agoston AT, Han HS, Mullen JT, Duda DG, Clark JW, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Modern Pathology.* 2016 Jul;29(7):772–84.
14. Ramos MFKP, Pereira MA, Amorim LC, Mello ES, Faraj SF, Ribeiro U, et al. Gastric cancer molecular classification and adjuvant therapy: Is there a different benefit according to the subtype? *J Surg Oncol.* 2019 Dec 3;jso.25792.
15. Zhao C, Feng Z, He H, Zang D, Du H, Huang H, et al. Protein expression-based classification of gastric cancer by immunohistochemistry of tissue microarray. Patel GK, editor. *PLoS ONE.* 2020 Oct 23;15(10):e0238836.
16. Laurén P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA: An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica.* 1965 Sep;64(1):31–49.
17. Costache S, Sajin M, Wedden S, D'Arrigo C. A consolidated working classification of gastric cancer for histopathologists (Review). *Biomed Rep.* 2023 Jul 19;19(3):58.
18. Nakamura Y, Kawazoe A, Lordick F, Janjigian YY, Shitara K. Biomarker-targeted therapies for advanced-stage gastric and gastro-oesophageal junction cancers: an emerging paradigm. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 Aug;18(8):473–87.
19. Alexa M, Hasenburg A, Battista MJ. The TCGA Molecular Classification of Endometrial Cancer and Its Possible Impact on Adjuvant Treatment Decisions. *Cancers.* 2021 Mar 23;13(6):1478.
20. Talhouk A, McAlpine JN. New classification of endometrial cancers: the development and potential applications of genomic-based classification in research and clinical care. *gynaecol oncol res pract.* 2016 Dec;3(1):14.
21. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. *Female genital tumours.* 5th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2020. (World health organization classification of tumours).
22. Costache S, De Havilland R, Diaz McLynn S, Sajin M, Baltan A, Wedden S, et al. Implementing an On-Slide Molecular Classification of Gastric Cancer: A Tissue Microarray Study. *Cancers.* 2023 Dec 21;16(1):55.

Lista lucrărilor științifice publicate

Articole publicate în reviste indexate ISI

1. Costache S, Sajin M, Wedden S, D'Arrigo C. A consolidated working classification of gastric cancer for histopathologists (Review). *Biomed Rep* 2023; 19(3):58. FI=2,3; integrat în cadrul capitolelor 1 și 2, paginile 4-26.
<https://doi.org/10.3892/br.2023.1640>
2. Costache S, De Havilland R, Diaz McLynn S, Sajin M, Baltan A, Wedden S, D'Arrigo C. Implementing an on-slide molecular classification of gastric cancer: a tissue microarray study. *Cancers* 2023; 16(1):55. FI=5,2; integrat în cadrul capitolului 5, paginile 36-107.
<https://doi.org/10.3390/cancers16010055>
3. Costache S, Baltan A, Diaz McLynn S, Pegoraro M, De Havilland R, Porter M, Lerga A, Thomas T, Chefani A E, Wedden S, Billingham K, D'Arrigo C. Implementing an integrated molecular classification for gastric cancer from endoscopic biopsies using on-slide tests. *Rom J Morphol Embryol.* 65(2), FI=1,2; integrat în cadrul capitolului 6, paginile 108-120.
https://rjme.ro/RJME/resources/files/CostacheSimona_RJME_65_2_2024.pdf

Participări la evenimente științifice

1. Costache S, Ciongariu AM, Chefani A, Costache M, Sajin M. The need to know more about gastric cancer: prevalence and features in a retrospective study, *Virchows Archiv*, Volume 479, Supplement 1, August 2021, E-PS-06-007 – abstract și prezentare poster în cadrul Congresului European de Patologie, ediția 33, 29-31 August 2021.
2. Costache S, Baltan A, Diaz McLynn S, Pegoraro M, De Havilland R, Porter M, Lerga A, D'Arrigo C, Wedden S, Billingham K. Molecular classification of gastric cancer using a small number of on-slide biomarkers for risk stratification and therapy selection – poster prezentat în cadrul Tucson Symposium - Roche, 23-24 Aprilie 2024, SUA.