



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" din BUCUREȘTI



ANUL
2024

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

*Implicarea patologiei digitale morfometrice și moleculare
în studiul tumorilor mezenchimale*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

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

**Student-doctorand:
MOLDOVAN VALENTIN TIBERIU**

2024

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București
Strada Dionisie Lupu nr. 37 București, Sector 2, 020021 România, Cod fiscal: 4192910
Cont: RO57TREZ70220F330500XXXX, Banca: TREZORERIE sect. 2
+40.21 318.0719; +40.21 318.0721; +40.21 318.0722
www.umfcd.ro

Cuprinsul tezei

Lista cu lucrările științifice publicate	i
Lista de abrevieri.....	ii
Introducere	1
Scop	2
Material și metode	3
Rezultate	3
Discuții.....	4
I. Parte generală.....	6
1. Introducere	7
2. Factori de risc. Etiologie. Epidemiologie	8
3. Aspecte de origine și linie celulară	10
4. Aspecte morfologice, histopatologice, imunofenotipice și de biologie moleculară implicate în diagnosticul EGIST	13
4.1. Aspectele clinico-imagistice și macroscopice.....	14
4.2. Histopatologie	15
4.3. Profilul imunofenotipic al EGIST afișat prin tehnici de IHC	18
4.4. Modificări genetice și moleculare	23
5. Factori implicați în stratificarea riscului de progresie și prognostic.....	25
II. Contribuții personale.....	31
6. Studiul întâi : Analiza spectrului imunofenotipic al tumorilor mezenchimale stromale extra-digestive	32
6.1. Prezentarea generală a studiului întâi.....	32
6.1. Introducere	33
6.2. Scop și Obiective	36
6.3. Material și metode.....	36
6.4. Rezultate.....	41
6.5. Discuții.....	68
6.6. Concluzii ale studiului întâi și direcții viitoare de cercetare	79
7. Studiul al doilea: Analiza digitală a corelației între suprafața microvascularizației tumorale și expresia ki67 în tumorile stromale extragastrointestinale.....	82

7.1.	Prezentarea generală a studiului al doilea	82
7.2.	Introducere	83
7.3.	Material și metode.....	86
7.4.	Rezultate.....	92
7.5.	Discuții	116
7.6.	Concluzii ale studiului al doilea.....	120
8.	Studiul al treilea: Analiza informatizată a factorilor imuni din micromediul tumorilor stromale extragastrointestinale.....	122
8.1.	Prezentarea generală a studiului al treilea.....	122
8.2.	Introducere	123
8.3.	Material și metode.....	127
8.4.	Rezultate.....	130
8.5.	Discuții.....	150
8.6.	Concluzii ale studiului al treilea.....	157
9.	Concluzii și contribuții personale	160
9.1.	Concluzii	160
9.2.	Contribuții personale.....	162
	Bibliografie	164
	Anexe	181
	Anexa 1 Avizele Comisiilor de etică ale instituțiilor	181

Introducere

Maladiile oncologice, afecțiunile legate de formarea și dezvoltarea neoplasmelor maligne, au fost recunoscute și documentate încă din antichitate, evidențiate prin scrieri istorice și observații medicale timpurii. Dintre cele cu origine mezenchimală prima mențiune este cea legată de papyrusul de la Ebers 1500 î.Hr (1) conține prima referire la o tumora a țesuturilor moi. Aceasta este menționată ca „o tumoare grasă”, cel mai probabil cu origine adipoasă, de tipul lipom. Părintele medicinei Hipocrate (460–375 î.Hr.) face distincția între carcinoame și sarcoame: „tumori superficiale și adânci la nivelul brațului și coapsei la persoanele în vârstă”. Charles Bell, chirurg britanic, (1774–1842), atrage atenția asupra trăsăturilor caracteristice care disting neoplaziile mezenchimale de cele de tip carcinom (2): „Cancerul moale poate ataca oricare dintre structurile corpului..., cu siguranță apare în substanța moale a membrilor”. În prezent prin sarcom se înțelege o proliferare tisulară malignă constituită din celule de origine mezenchimală, excluzându-le pe cele hematopoietice. Lista afecțiunilor maligne și benigne ce au această conotație este semnificativă cuprinzând peste 80 de entități ce au fost incluse în clasificarea tumorilor de țesuturi moi și osoase (3–5).

Proliferările neoplazice de tip EGIST și GIST au fost subiectul unui interes constant al echipei de cadre didactice condusă de doamna profesor Sajin M., fapt ce a contribuit direct și indirect la realizarea a numeroase articole în domeniul tumorilor stromale gastro-intestinale. EGIST necesită investigarea cu metode morfologice, imunohistochimice și de biologie moleculară. EGIST și GIST-urile sunt cunoscute pentru diversitatea lor moleculară, în special asocierea cu mutațiile genei KIT sau PDGFRA. Acest aspect oferă oportunități de studiu a mecanismelor moleculare. Înțelegerea particularităților anatomopatologice ale GIST-urilor poate fi benefică atât pentru cercetarea științifică, cât și pentru îmbunătățirea managementului clinic al pacienților afectați de aceste tumori mezenchimale.

Metodele de diagnostic asistat de calculator sunt orientate către recunoașterea de imagini și identificarea arborilor de apreciere a parametrilor semicantitativi histomorfometrici. Afirmarea că ele vor deveni instrumente de lucru indispensabile în viitorul apropiat este plauzibilă, deja fiind utilizate cu caracter experimental în domenii diverse, cum ar fi diagnostic diferențial și terapie în medicină internă și hematologie.

Termenul „GIST” a fost folosit pentru prima dată în 1983 de către Mazur și Clark (6) pentru a descrie tumori gastrice cu diferențiere mezenchimală. Pentru cele cu o morfologie asemănătoare celor cu origine în creasta neurală s-a preferat utilizarea termenului generic de tumori de teci nervoase autonome (gastric autonomic nerve sheath tumors - GANT) descrise pentru prima oară de către Harrera (7,8). Descoperirea în 1998, de către Hirota și colegii săi, a faptului că celulele tumorale GIST au adesea mutații la nivelul genei KIT, a marcat momentul reclasificării sarcoamelor gastrointestinale (9). Majoritatea tumorilor diagnosticate anterior ca tumori nervoase autonome gastrointestinale (GANT) au fost reclasificate ca GIST ulterior demonstrării prezenței de mutații KIT. Tumorile stromale extradigestive (EGIST) reprezintă sarcoame cu diferențiere către celule asemănătoare celulelor Cajal însă cu localizare extradigestivă. Incidența pentru EGIST se estimează că reprezintă un procent mai mic de 5% din totalul tumorilor stromale digestive (10–12). Ele comportă un profil similar celor de tip GIST atât din punct de vedere mutațional cât și din punct de vedere morfologic și imunofenotipic (8,13). Mutații KIT se regăsesc și în GIST-uri sub-centimetrice, ceea ce sugerează că mutația KIT este evenimentul tumorigen inițial în majoritatea GIST-urilor (14).

Scop

Scopul lucrării este analiza spectrului morfologic și imunofenotipic al tumorilor mezenchimale gastro-intestinale stromale extradigestive cu analiza semi-cantitativă digitală a micromediului tumoral.

Obiective

În vederea atingerii scopului propus am stabilit următoarele obiective:

- Evaluarea prevalenței cazurilor de EGIST în laboratorul de lucru al departamentului de anatomie patologică
- Analiza și evaluarea tehnicilor de lucru pentru diagnosticul modern al tumorilor de tip EGIST
- Analiza micromediului tumoral al EGIST din punct de vedere al neo-vascularizației induse, pe categorii histologice, utilizând procese și tehnici de lucru specifice patologiei digitale în vederea obținerii unor parametrii semicantitativi comparabili.
- Evaluare răspunsului imun al gazdei la procesul neoplazic cu identificarea și cuantificarea principalilor actori în imunitatea celulară nativă anti-tumorală incluzând localizare și vârstă.

Material și metode

Studiile efectuate au la bază investigarea bazelor de date, a histotecilor și arhivelor Institutului Național de Patologie „Victor Babeș” (INCDVB) precum și cele ale Spitalului Universitar de Urgență București (SUUB). Cercetările au fost efectuate având acordul comisiilor de etică a instituțiilor menționate. Perioada de studiu a EGIST a fost integralitatea cazurilor diagnosticate în perioada 2005-2021 (16 ani). Studiile histopatologice și testele imunohistochimice (IHC) au fost efectuate pe fragmente de țesuturi incluse la parafină. Examinările IHC au fost efectuate folosind un protocol indirect pe platformele Leica Bond II, cu anticorpi Leica Novocastra, Agilent și Abcam gata de utilizare. Au fost utilizați după caz cocktail-uri de pancitokeratină, Vimentin, S100, Desmin, CD34, CD117, DOG1. Examenle imunohistochimice ale fiecărui lot de lame au fost desfășurate cu lame de țesut de control pozitiv extern în paralel cu lotul la studiu.

Lamele obținute și cele deja existente au fost scanate integral utilizând sistemele Aperio T2 și Aperio LV1, producător Leica Microsystems. Fișierele rezultate au fost examinate utilizând software-uri de analiză a imaginii - QupathM6 și Aperio-ImageScope. S-a procedat la analiza de imagine urmărindu-se estimarea suprafeței de perfuzie precum și răspunsul imunitar al gazdei. Parametrii semicantitativi pentru fiecare obiectiv au fost concepuți și verificați prin sondaj manual repetat. Datele rezultate au fost prelucrate statistic utilizând atât pachetul de analiză statică GNU PSPP(v 1.6) cât și, respectiv, utilizând foile de calcul tabelar din pachetul MSOffice 365 – Excel extins cu pachetul de analiză statică pentru efectuarea graficelor și colectarea tabelară uniformă normată.

Rezultate

Investigațiile efectuate asupra bazelor de date ale instituțiilor au produs un lot de 51 de cazuri EGIST (n = 51). Vârsta la momentul diagnosticului a variat între 26 și 80 de ani (media 56,15 ani). Raportul de gen, bărbați /femei, a fost de 1: 2. Localizarea primară a EGIST în lotul la studiu a fost preponderent în regiunea abdominală (42 de cazuri - 82%). Majoritatea cazurilor (50%) au dovedit un profil convențional IHC: expresie DOG1, împreună cu pozitivitate pentru Vimentin, CD117 și CD34. 10 cazuri (20%) au avut expresia cKIT absentă. Numărul de analize efectuate a variat profund, fiind influențat în primul rând de localizarea neobișnuită pentru aceste neoplasme, situându-se între 7 și 18 teste efectuate per caz.

Pentru studiul micro-vascularizației am selectat douăzeci și patru de cazuri (n = 24). Vârsta medie a fost de 56 de ani (56,15 ani) și un raport de gen de 1 la 1. Parametrii de

interes au fost obținuți folosind metodele de analiză digitală. Au fost de asemenea calculate suprafața vasculară și perimetrul vascular. Rezultatele analizei statistice au arătat corelația dintre indicele de proliferare al tumorii și raportul dintre aria de perfuzie și aria tumorii investigate a demonstrat un tip de asociere negativ proporțional ($r = -0,5506$ și un p de $0,0051$).

Investigarea infiltratelor limfocitare intratumorale prin tehnici de analiză de imagini a arătat o predominanță a liniei de celule T față de linia de celule B în cazul EGIST. În medie, CD5 pozitiv a fost de $1,6 \cdot 10^3$ celule/mm². TIL pozitiv pentru CD20 a arătat o densitate medie de 263 limfocite B / mm². Numărarea TAM folosind parametrii de restricție ai dimensiunii nucleare și detectarea CD45 nu a dat rezultate coerente. Cuantificarea agregatelor de celule limfoide per probă a înregistrat o medie de 2,41 focare/probă.

Discuții

Studiul prezent a putut evidenția spectrul imunofenotipic și morfologic variabil al EGIST-urilor, crescând conștientizarea siturilor acestor entități. Markerul IHC de elecție pentru EGIST este DOG1, împreună cu un marker suplimentar pentru a evidenția diferențierile față de un profil celular asemănător Cajal (CD117 și PDGFRA secundar). CD34, CD10 și SMA au o utilizare redusă pentru confirmarea liniei celulare. Diagnosticul histopatologic rămâne instrumentul cel mai practic și de încredere, cu costuri mai mici în comparație cu biologia moleculară (secvențiere extinsă). Seria de cazuri este voluminoasă comparativ cu alte serii de cazuri publicate în literatura de specialitate. Din punct de vedere morfologic studiul a relevat aspecte clasice ale proliferărilor tumorale dar și aspecte mai puțin întâlnite, identificând primul EGIST cu metaplazie condroidă - o caracteristică raportată doar în GIST până la momentul publicării studiului.

Descoperirile noastre sugerează că în EGIST-urile de grad înalt există o corelație inversă între gradul de activitate a tumorii și suprafața de vascularizare. Este necesară o confirmare a rezultatelor studiului efectuat pe loturi mai mari. Studiul suferă limitările impuse de raritatea acestui sarcom, însă examenul histopatologic digital reflectă un instantaneu al unei structuri dinamice vasculare care răspunde la o mare varietate de stimuli.

În studiul nostru am putut evidenția spectrul imunofenotipic morfologic variabil al TIL EGIST-urilor. Principalul actor celular în răspunsul imun la prezența EGIST sunt TIL-ul de tip T. Dispoziția TIL și TLS este neomogenă în EGIST. Am subliniat potențialul densității TIL ca un parametru histologic independent de varianta morfologică, precum și de rata proliferativă.

Per total, lucrarea de față comportă o abordare a particularităților micro-mediului tumoral al EGIST. În ansamblu, studiile efectuate au un caracter interdisciplinar făcând apel la tehnicile de prelucrare și analiza de imagini.

Studiul întâi : Analiza spectrului imunofenotipic al tumorilor mezenchimale stromale extra-digestive

Tumorile stromale gastrointestinale sunt neoplasme care se diferențiază spre celulele cu morfologie și imunofenotip asemănător celulelor Cajal. Localizarea extra-abdominală acestor tumori este dificil de diagnosticat în practica curentă anatomopatologică. Frecvent sunt necesare studii de biologie moleculară și consult expert în acest domeniu. Avantajele patologiei în acest sens fie ea de tip morfologic – histopatologic fie de tip molecular, sunt incontestabile.

În acest sens am investigat retrospectiv o serie de 51 de cazuri EGIST prezentate la nivelul INCDV Babeș București și SUUB cu scopul de a explora imunofenotipurile exprimate și de a analiza procedurile, numărul și utilitatea anticorpilor necesari pentru un diagnostic pozitiv. De asemenea, am analizat datele referitor la frecvența acestei patologii în practica curentă urmate de o revizuire a literaturi de specialitate în sensul ameliorării practicii curente diagnostice.

Metoda de lucru s-a bazat pe interogarea bazelor de date electronice și scriptice instituționale a cazurilor ce au comportat un diagnostic de EGIST în perioada 2005-2021. Lamele au fost scanate integral, iar imaginile rezultate au fost revizuite de doi patologi cu experiența în diagnosticul patologiei generale și interes particular în tumorilor de origine mezenchimală. Pentru cazurile cu dificultăți diagnostice, cele cu o conservare improprie a lamelor histologice, examinările imunohistochimice au fost refăcute după caz, pentru diverși markeri (de exemplu: pancitokeratină, ki67, DOG1 și PDGFRA). Din analiza bazelor de date ale celor două instituții a rezultat un număr de 54 de cazuri de tumori de tip EGIST. După selecția cazurilor prin îndepărtarea dublurilor / recidivelor, a cazurilor cu diagnostic incert, a determinărilor secundare/a metastazelor, a rezultat un număr de 51 cazuri. În seria la studiu localizarea principală a tumorii a fost la nivel abdominal în 43 de cazuri (84%). Majoritatea tumorilor au prezentat celularitate de tip fuziform, urmată de tipul mixt și epitelioid – reprezentarea grafică este demonstrată în Figura 1.

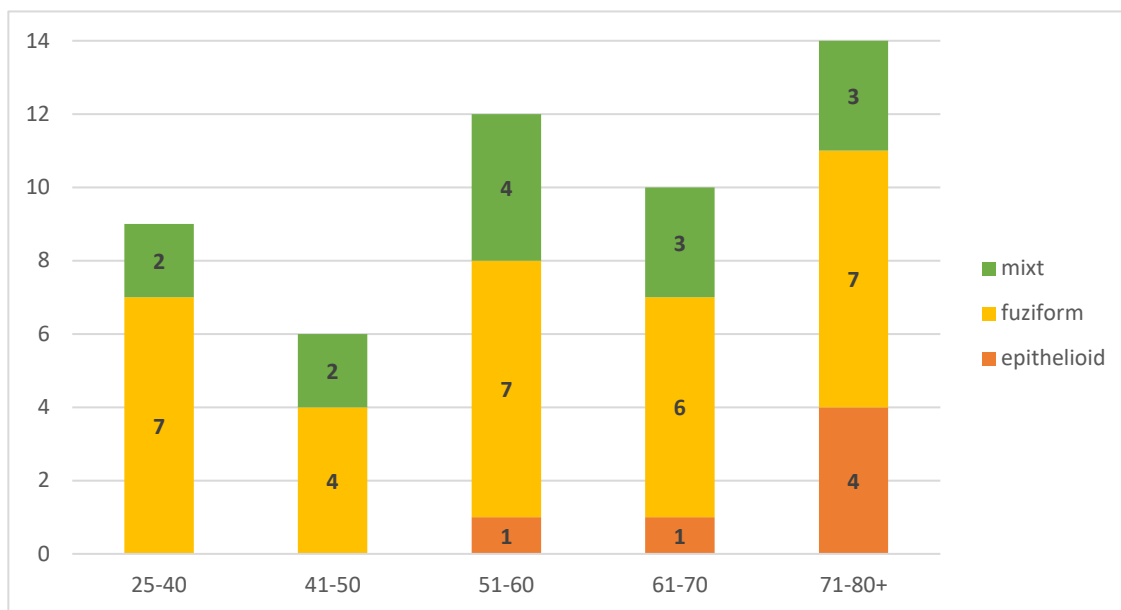


Figura 1 Grafic cu reprezentarea distribuției pe categorii de vârste a lotului de EGIST la studiu. Se notează vârfuri de incidență în decada de 50 de ani și un al doilea după 70 de ani.

Unele cazuri analizate microscopic comportau aspecte histopatologice particulare, neobișnuite pentru morfologia convențională. Astfel unele dintre acestea sunt conform expectanțelor în cazul EGIST: cum ar zone sincițiale și degenerescență mixoidă (prezente într-un număr de 3 cazuri, vezi Figura 2), în timp ce în altele sunt întâlnite aspecte excepționale, rare, ce pot induce erori diagnostice în activitatea curentă. Astfel, s-a identificat pentru un (1) caz zone ce comportă arii de metaplazie condroidă hialină; iar pentru trei cazuri s-a notat prezența de celule tumorale multinucleate dispersate. Notabil pentru cazurile ce comportă celule multinucleate este pozitivitatea pentru markeri tumorali, și negativitate pentru cei histiocitari.

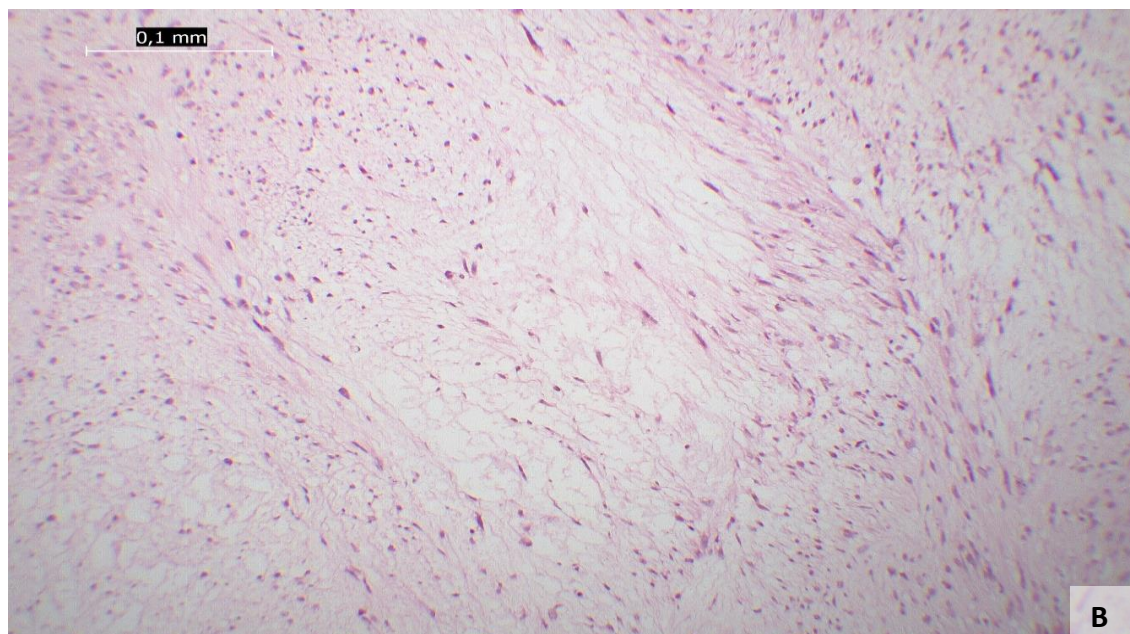
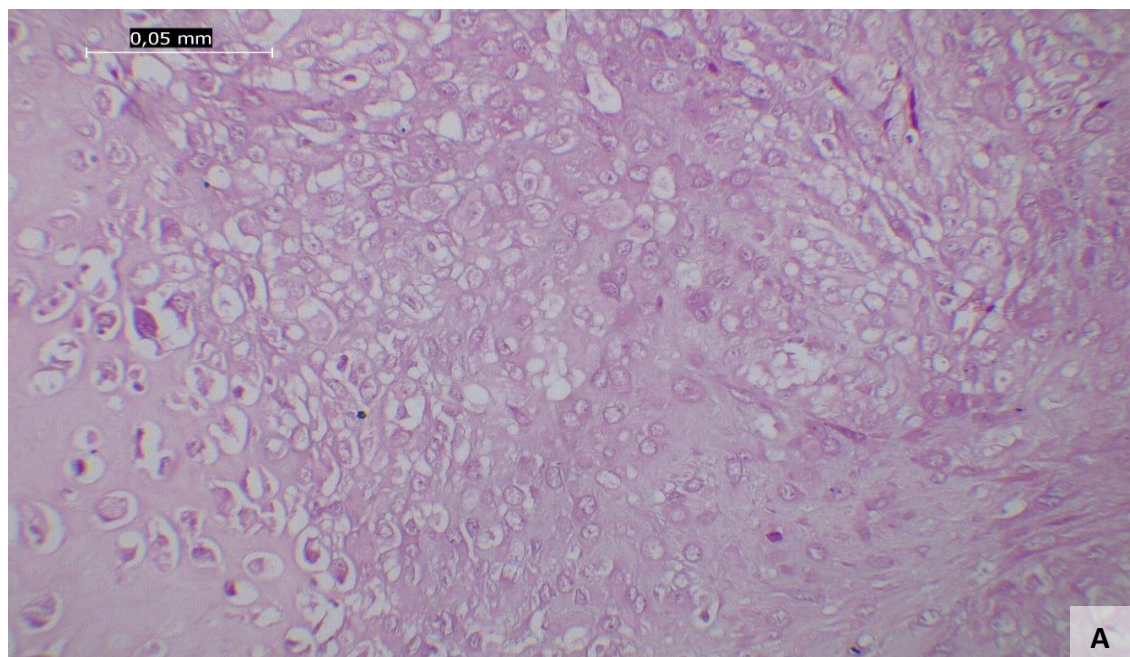


Figura 2 EGIST – particularități ale stromei. Cazuri excepționale au demonstrat modificări metaplazice de tip condroid (A). Acestea sunt vizibile ca o matrice incomplet matură în care celule tumorale se inter-mixează cu aspecte de tip loje în care se regăsesc celule tumorale retractate. În panelul de jos (B) se notează degenerescența mixoid-edematoasă a stromei cu tendința de a forma micro-cavități. Colorație HE, captură foto-digitală cu reper metric în colțul din stânga sus al imaginii.

Notabil ca doar 26 de cazuri (51%) au demonstrat un profil imunohistochimic convențional complet: pozitivitate pentru Vimentină, CD117, CD34 și DOG1. În 10 cazuri expresia c-KIT a fost absentă în timp ce imunofenotipul pentru CD34 a fost păstrat în toate cele 10 cazuri. Prezența unor expresii focale aberante pentru markeri de linie tumorală

mezenchimală cum ar fi actină musculară , ce pot suplimentar conturna diagnosticul - în exemplu Figura 3. Dintre aceste cazuri, 8 cazuri s-au dovedit pozitive pentru PDGFRA. În studiul nostru am găsit un subgrup de 8 cazuri care s-au prezentat în locații nu doar extra-digestive dar și extra-abdominale (printre acestea, primul EGIST pulmonar raportat și două cazuri cu localizări la nivelul sferei ORL - cap și gât). În final, din analiza efectuată și revizia literaturii de specialitate se concluzionează că EGIST reprezintă un subgrup provocator histologic și imunohistochimic, cu un comportament adesea agresiv, mai des cKIT negativ și PDGFRA pozitiv, comparativ cu GIST. Din analiza eficienței markerilor imunohistochimici s-a concluzionat că pentru un diagnostic pozitiv markerul de elecție

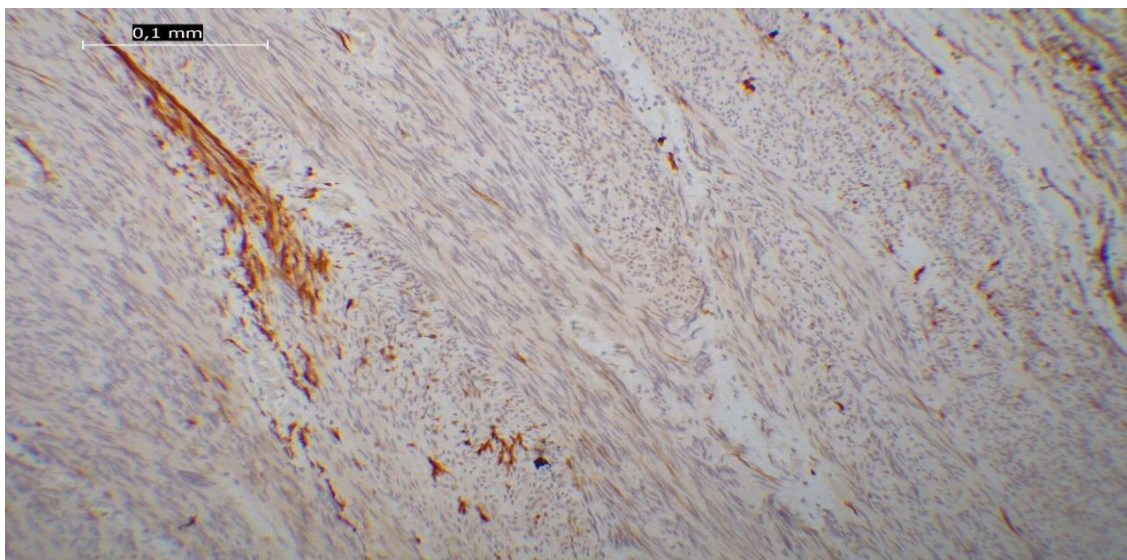


Figura 3 Imunofenotip EGIST cu reactivitate la SMA. Marcaj intens variabil distribuit la nivelul unor fascicule de celule tumorale. Marcajul poate fi variabil sau difuz distribuit dar nu este acompaniat de alți markeri de fibra musculară netedă (cum ar fi caldesmonă) Control intern pozitiv în vase musculare de calibru mic. Contra colorarea cu hematoxilină. Bara de pentru scară directă metrică localizată în colțul din stânga sus.

rămâne DOG1 indiferent de localizarea proliferării, în timp ce CD34 și CD117 ar trebui considerate ca adjuvanți în localizarea extradigestivă a tumorilor stromale gastrointestinale.

Sursa tumorilor mezenchimale de tip stromal extradigestiv a fost multă vreme discutată. Una dintre ipoteze se referă la maturarea locală a unor precursori pe direcția liniei celulare Cajal, fapt ce implică apariția unei mase izolate de natură cormitomică plauzibil din perioada de dezvoltare. Ulterior aceasta poate fi expusă unei mutații la nivelul genei cKIT și să devină sursă de tumori mezenchimale, unele cu diferențiere extradigestivă. În acest sens au fost analizate pe o perioadă de trei anii existența unor potențiale surse hamartomatose sau cormitomice apărute în perioada de dezvoltare analizând buletinele de analiză histopatologică a sarcinilor oprite în evoluție și a produselor de chiuretaj pentru întreruperile

voluntare de sarcină. Rezultate au fost puțin încurajatoare, s-a identificat un sigur caz de tumoare mezenchimală cu diferențiere trilineară pseudo-hamartomasă (15).

Studiul al doilea : Analiza digitală a corelației între suprafața microvascularizației tumorale și expresia ki67 în tumorile stromale extragastrointestinale

Angiogeneza în micromediul neoplazic este o țintă terapeutică promițătoare, având în vedere principiul fundamental conform căruia nu există proliferare neoplazică fără neovascularizație. Deși rolul angiogenezei în dezvoltarea EGIST este relativ insuficient studiat, este oportun aprofunda caracteristicile procesului de vascularizație tumorală pentru a dezvolta strategii terapeutice eficiente. În cazul EGIST, această componentă este relativ puțin explorată, justificând astfel eforturile de a descrie și caracteriza procesul de vascularizație tumorală în această categorie aparte de tumori.

Obiective: Descrierea statusului vascular ca o perspectivă asupra neo- angiogenezei într-o selecție de tumori stromale extra-gastrointestinale identificate în cadrul studiului întâi. Studiul urmărește identificare de parametrii cuantificabili prin tehnici de patologie digitală și corelarea lor cu gradul tumoral. Parametrii cuantificați vor caracteriza procesul de angiogenză cum ar fi numărul capilarelor și suprafața vasculară pe unitatea de suprafață. Într-o etapă secundă rezultatele obținute vor fi procesate statistic pentru stabilirea corelațiilor dintre factorii histoprognoștici uzuali și indicele de proliferare, gradul de diferențiere, variantă histologică.

Metodă: Din cadrul lotului utilizat în studiul I, am selectat un sublot de cazuri EGIST din populația identificată în arhivele instituției noastre, ținând cont de criteriile de selecție stabilite pentru a asigura o reprezentare relevantă a populației de tumori. Datele rezultate au fost revizuite de doi patologi. S-au efectuat teste imunohistochimie pentru evidențierea structurii vasculare a tumorilor (CD31 – vezi Figura 4; D2-40 și CD34) precum și determinarea indicelui proliferativ folosind marcaj imunohistochimic la Ki67. Lamele histopatologice rezultate au fost scanate integral utilizând AperioLV1 Leica. Imaginile digitale rezultate din procesul de scanare de pe întreaga lamă histopatologică au fost procesate în softul de analiză de imagine Qupath pentru a evalua densitatea micro vaselor și suprafața vasculară împreună cu suprafața regiunii de interes. Datele numerice obținute au fost prelucrate statistic cu ajutorul Microsoft Excel Statistic Package 365.

Rezultate: Analiza statistică a datelor rezultate în urma măsurătorilor efectuate a relevat o corelație negativă între indicele de proliferarea tumorii și suprafața vasculară,

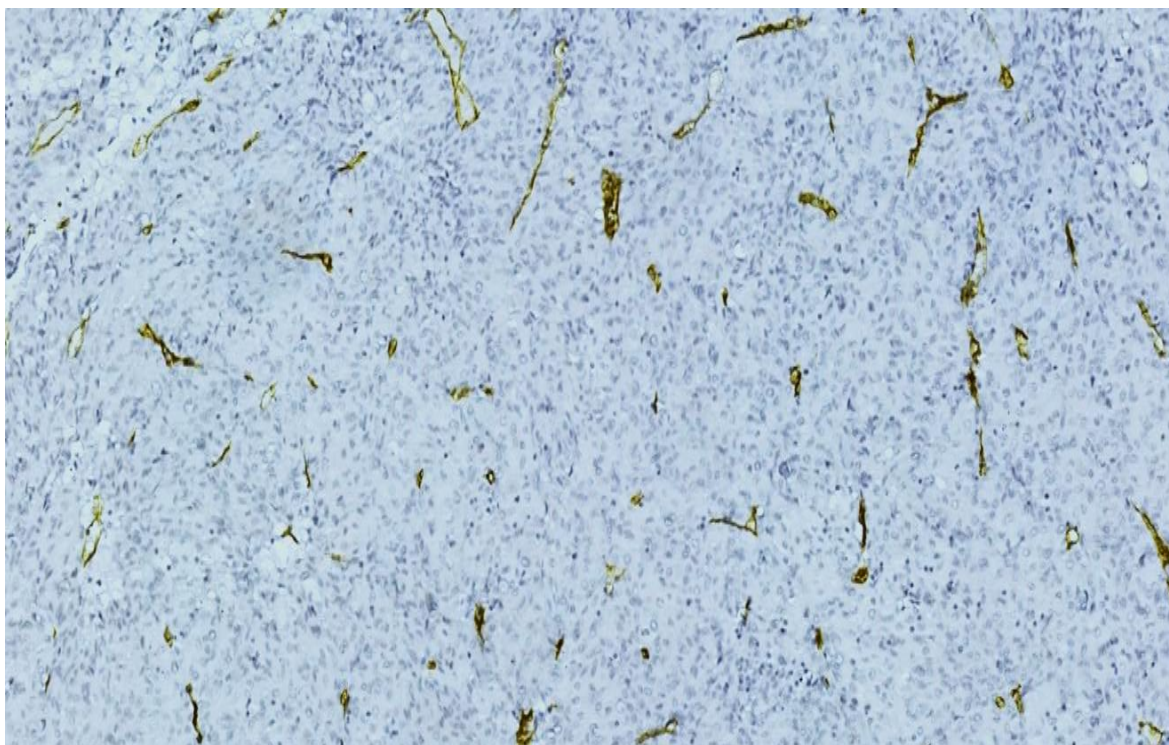


Figura 4 EGIST epitelioid – marcaj la CD31. Capilare de mici dimensiuni sunt facil identificabile după imunhistomarcaj. Calculul suprafeței vasculare în aceste condiții necesită corelare cu aria tumorală deservită. Colorație hematoxilină – eozină, captură de imagine utilizând AperioImagescope pentru vizualizare lamă scanată integral bara de dimensiuni în stânga jos în micrometri.

normalizată la suprafața examinată a tumorii ($r = -0,5506$ și un p de $0,0051$). O corelație între densitatea microvaselor (număr de capilare pe unitate de suprafață) și indicele proliferativ al tumorii nu a putut fi stabilită în seria noastră de EGIST ($p = 0,035$) Reprezentarea grafică este demonstrată în graficul din Figura 5.

Concluzii: Tumorile stromale extra-gastrointestinale intens proliferative au o suprafață micro-vasculară redusă în comparație cu cele de grad scăzut. Constarea este plauzibilă în contextul unei expansiuni tumorale ce depășește rata de dezvoltare a angiogenezei. Procesul de angiogenă și corelarea lui cu proliferare tumorale necesită aprofundarea asupra aspectelor ce determină metabolismul tumoral pentru corelarea cu structurilor morfologice având în vedere că atât aria vasculară cat și permeabilitatea endoteliului nou format sunt influențate de factori vaso-activi (constrictori sau dilatatori) endogeni ai organismului gazda

dar și a agenților terapeutic- anestezici intra operatori. În continuarea ipotezei confirmate a unei relații dintre parametrii vasculari și rata de proliferare tumorală, studiul efectuat sugerează că terapia anti-angiogenică ar avea o contribuție minoră în tratamentul EGIST de grad înalt.

Studiul al treilea: Analiza informatizată a factorilor imuni din micromediul tumorilor stromale extragastrointestinale

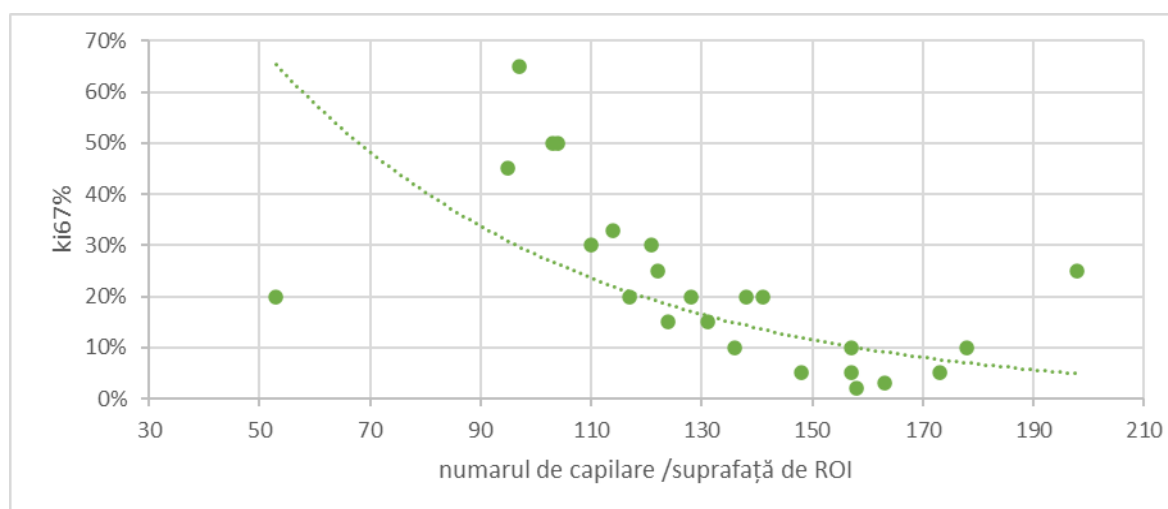


Figura 5 Grafic privind distribuia cazurilor în funcție de variabilele considerate ki67% și numărul total de capilare per ROI pe caz. ($n = 24$). Excluzând extremele (53×20 ; 97×65 și 198×25) se observă un aspect pseudo- grupat în jurul unui nor central delimitat pentru intervalul 2-33% Ki67 axa verticală (0y-ordonată) și respectiv 95-178 de capilare / ROI.

Tumorile stromale extra gastrointestinale (EGIST) sunt sarcoame sunt predispuse la diverse evenimente care declanșează răspunsul inflamator al gazdei. Exemple de evenimente ce pot declanșa astfel de fenomene inflamatorii sunt cele legate de variațiile debitului de perfuzie, fie sub forma de tensiuni de intrare a sângelui, fie a calibrului vascular sub influența a diverși factori vasoconstrictivi sau vasoplegici. Vasele de neoformație au o rezistență scăzută din punct de vedere structural, ele fiind dezvoltate inițial ca simple canale endoteliale fără o dispunere arborizată. Astfel de structuri vasculare vor fi caracterizate de o fragilitate crescută la variațiile presionale și de stres mecanic de vecinătate. Vascularizația variabilă așa cum am menționat, factorii compresivi mecanici extrinseci, precum și apariția în vecinătate a unor zone cu vascularizație duală (șunturi), favorizează apariția de fenomene hemoragice ce sunt urmate de reacții inflamatorii. Un răspuns inflamator similar se poate întâlni în cazul tumorilor ce sunt caracterizate de o creștere rapidă, la nivelul cărora coexistă

arii de inflamație cu zone de necroză tumorală. Indiferent de mecanismul de producere, răspunsul inflamator va recruta o populație leucocitară ce influențează ritmul de creștere tumorală.

Obiective: În acest studiu am analizat retrospectiv, tipul și cantitatea de limfocite intratumorale pe un număr de 22 cazuri din seria de EGIST-uri evaluate în cadrul studiului I. Studiul s-a focalizat pe compoziția primară de linie dar și densitatea celulară. Au fost derulate studii de corelație statistică pentru a evidenția eventuale particularități între răspunsul imun al gazdei și indicele de proliferare pe de o parte, dar și între densitatea limfocitară și modificări de morfologie.

Metode: Folosind anticorpi împotriva CD5, CD20, CD45, am pus în evidență celulele imune intratumorale precum și structurile limfoide, prin utilizarea tehnicilor imunohistochimice. Lamele histopatologice au fost scanate integral și analizate digital utilizând soft-ul QuPath pentru a selecta și calcula densitatea limfocitelor tumorale infiltrate (LTI). Structurile limfoide terțiare (SLT) au fost raportate pe fiecare probă. Analiza statistică a fost realizată folosind testul Kruskal-Wallis corectat și coeficientul Pearson. Analizele statistice asupra unui subset de 19 cazuri au inclus corelația Pearson, testele Kruskal-Wallis și corecțiile Bonferroni pentru a stabili corelații între expresia Ki67 și densitățile TIL, precum și asocieri legate de vârstă.

Rezultate: Din seria de cazuri identificate la în studiul I, am selectat 22 de pacienți cu o vârstă medie de 51 de ani. Din punct de vedere histologic, lotul a fost compus din EGIST-uri de tip histologic fusiform, epitelioid și de tip mixt (în proporții de 63%; 14% și respectiv 23%). Analiza numerică a lamelor imunohistochimice a arătat o medie indicelui de proliferare, calculat cu ajutorul imunohistomarcajului la Ki67 de 19%. Densitatea medie TIL de linie T și B a fost de $1,6 \cdot 10^3$ celule/mm² (prezentarea modului de calcul în Figura 6) și respectiv pentru limfocite B de 263 celule/mm². TLS au fost identificate cu o medie de 2,41 focusuri/eșantion examinat (în exemplu prezentate în Figura 7). Corelația dintre Ki67 și densitatea celulelor T și B ca TIL arată un $p > 0,05$ în seria de EGIST-uri selectate. Corelația dintre variantele histologice de EGIST și densitatea de tip TIL a demonstrat un $p > 0,05$. Aplicarea corecției Bonferroni pentru seriile mici de cazuri a demonstrat asocieri semnificative între Ki67 și celulele pozitive TIL-CD05/CD20. Corelațiile legate de vârstă au fost notate, evidențiind complexitatea din micro-ambientul tumorii – prezentarea grafică a acestor distribuții este facil vizibilă în Figura 8.

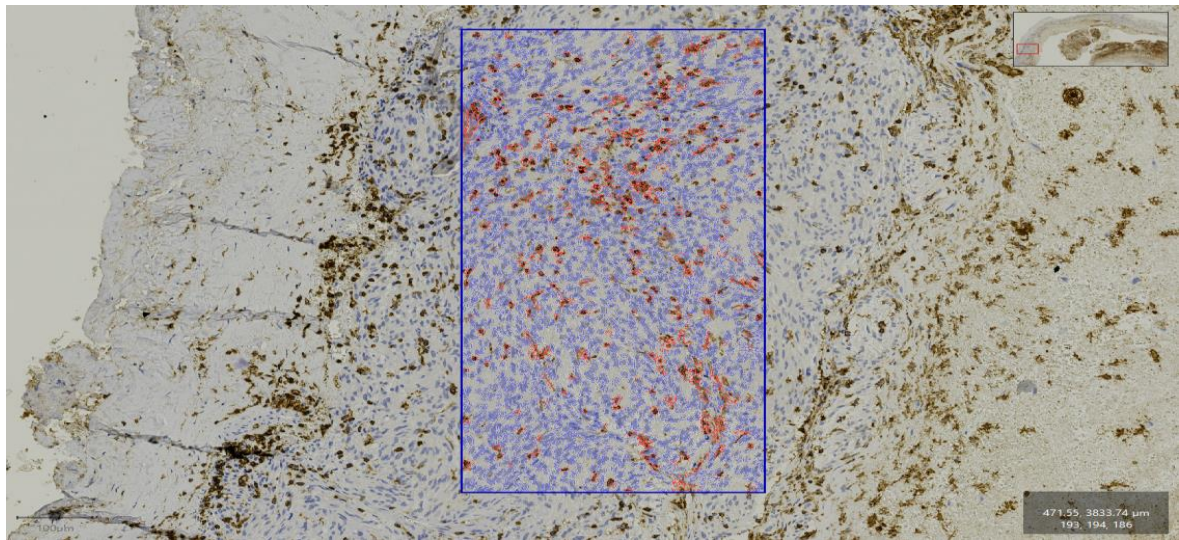


Figura 6 EGIST fuzocelular cu localizare parieto-abdominală. Detecția celulelor tumorale prin analiza de imagine marcaj pozitiv la CD5 în roșu. În periferie dreapta zona chistizată, cu acumulare de infiltrat limfocitar degradat parțial de numeroase macrofage cu corpi tingibili. Contra-colorare hematoxilină revelare DAB. Bară de dimensiuni situată în stânga jos.

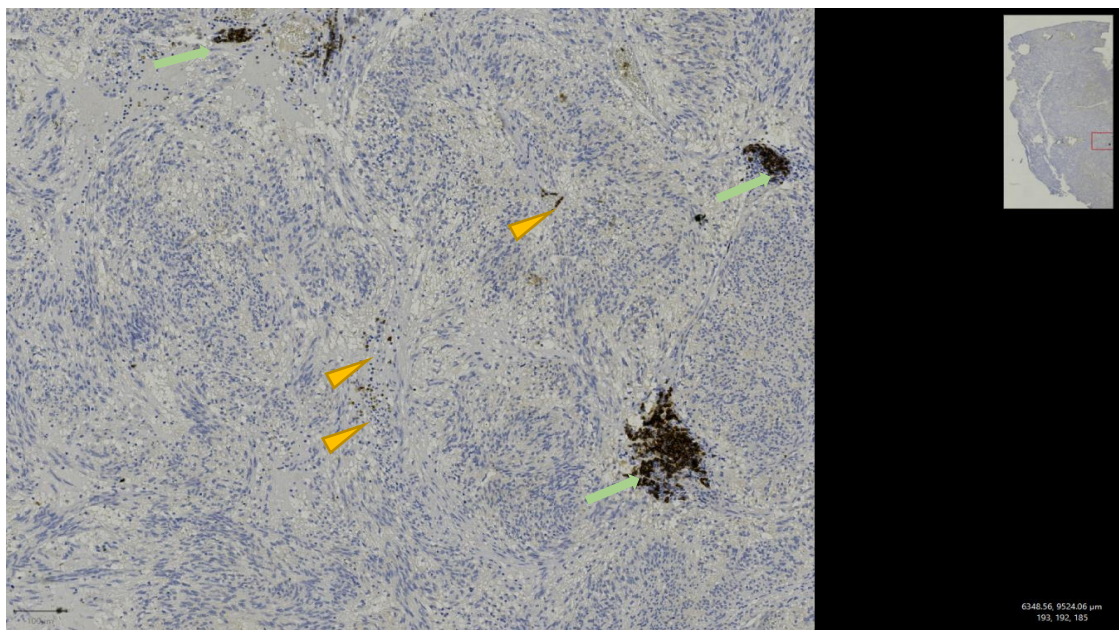


Figura 7 Marcaj pozitiv la CD20 în leucocite intratumorale într-un EGIST. Se observă structuri limfoide terțiare, marcate cu săgeți verzi și limfocite B izolate marcate cu cap de săgeată galbenă. Captură de ecran prin exportare lamă histopatologică scanată integral analizată în Qupath v0.3.2. Bară de dimensiuni situată în stânga jos. Contra-colorare hematoxilină revelare DAB.

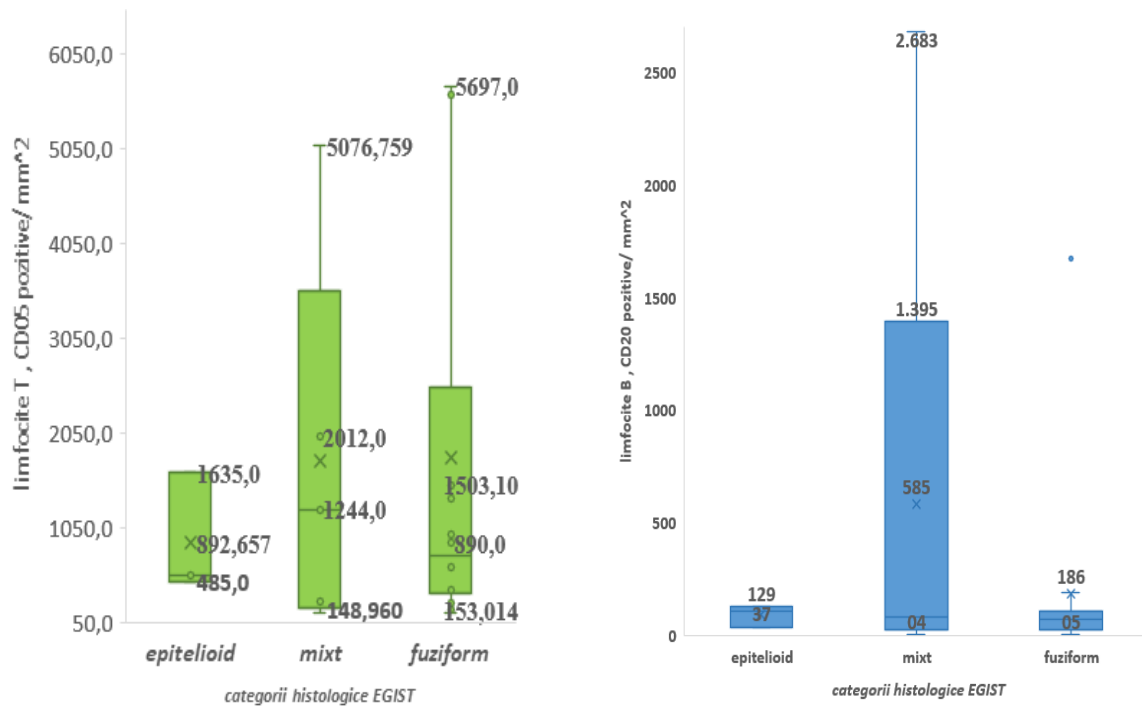


Figura 8 Grafice prezentând distribuția densității intratumorale a limfocitelor T și B, pe categorii histologice. Valori minime în cadrul EGIST epitelioid și a celor fuziforme în timp ce variantele mixte ocupa plaje vaste de valori atât pentru Limfocite T (panoul din dreapta) cât și pentru limfocite B panoul stâng.

Concluzii: Densitatea TIL și TLS sunt parametri histologici independenți de Ki67, de rata de proliferare și de tipul histologic al EGIST. Infiltratul TIL este neomogen în EGIST-uri, cu predominanță de celulele limfocitare T. Structurile limfoide terțiare de tip matur sunt distribuite neomogen în cadrul EGIST. Atât TLS cât și TIL sunt pot fi cuantificați prin tehnici de patologie digitală și pot fi folosiți ca și parametri în aprecierea răspunsului imun imediat și a capitalului imun recrutabil în terapia imună tumorală.

Concluzii și Contribuții personale

Pe parcursul întregului proces de cercetare am abordat punctual metodele de diagnostic și analiza micromediului tumoral apelând la tehnici de patologie digitală în ceea ce privește analiza de imagini precum și studii semicantitative. Concluziile celor trei studii asupra seriei de cazuri examinate pot fi sumarizate astfel:

1. EGIST este o entitate tumorală ce poate fi localizată intra- și extra-abdominal, Diagnosticul morfologic al EGIST este imperios necesar a fi susținut cel puțin de teste IHC extensive, completate cu testarea mutațiilor caracteristice: cKIT, PDGFR. Tumorile EGIST, similar cu cele GIST, au un profil imunohistochimic similar incluzând spectrul mutațional. Markerul IHC de elecție pentru diagnosticul pozitiv de EGIST este DOG1, însă însoțit de un marker suplimentar pentru a confirma diferențierea către un profil celular al celulelor Cajal (CD117 și PDGFRA secundar). Alți markeri cum ar fi Nestina, SDH și PDGFR au utilizare limitată. Aceștia sunt utili în cazuri particulare: cazuri dublu negative CD117 și DOG1 - markeri de linie celulară negativi. Markerii imunohistochimici convenționali în diagnosticul GIST, cum sunt CD34, CD10 și SMA, au o utilizare redusă pentru confirmarea liniei celulare și utilitate redusă în diagnosticul direct al EGIST.

2. Diagnosticul histopatologic combinat cu cel imunohistochimic rămâne instrumentul cel mai practic și de încredere în practica clinico-diagnostică. Costurile sunt mult reduse în comparație cu cele din metodele de biologie moleculară (cu secvențiere extinsă) fiind util în diagnosticarea a cel puțin 95% din EGIST – confirmat prin studiul efectuat.

3. În cadrul studiului nostru utilizând evaluarea digitală a Ki67 cu ajutorul filtrelor morfometrice s-a dovedit dificil realizabilă fiind necesară revizuirea individuală a fiecărei regiuni de interes. Tehnica este plauzibil de implementat însă necesită protocoale de lucru pre-analitice standardizate.

4. Din cercetările efectuate în cadrul studiului întâi a rezultat că diagnosticarea EGIST cu localizare în afara cavității abdominale este cu aproximativ 50% mai laborioasă comparativ cu numărul de teste pentru diagnosticarea EGIST. Astfel numărul de teste IHC pentru diagnosticul morfologic al unui EGIST abdominal este estimat la aproximativ 10 teste /caz iar pentru o localizare extra-abdominală acesta poate depăși cu ușurință 16 teste pentru fiecare caz, fiind necesară reconfirmare prin analize de biologie moleculară.

5. Cel de al doilea studiu al lucrării s-a concentrat asupra aprecierii microvascularizației unei selecții de cazuri din lotul la studiu de EGIST. Analiza digitală de imagine a permis caracterizarea eficienței detecției digitale a structurilor vasculare în cazul EGIST prin diverse metode informatice (substructive cu ajutorul CD34, versus aditivă prin intermediul CD31). În condiții de cost similare, cele mai consistente rezultate, prin consecință cel mai util marcaj pentru analiza digitală structurilor vasculare în EGIST, se dovedește a fi cu anticorpi primari anti CD31.

6. În cadrul studiului 2 menționat la punctul anterior, datele colectate din analiza digitală de imagine au demonstrat existența unei relații între densitatea micro-vascularizației intratumorale și rata de multiplicare tumorală, o corelație non-liniară de tip negativ. Din aceasta constatare se poate deduce, susținut prin datele de cercetare personală, că viteza de proliferare vasculară și rata de multiplicare tumorală nu sunt sincronizate (nu sunt corelate direct proporțional /pozitiv) pentru susținerea necesarului metabolic tumoral al EGIST. Aceasta perspectivă necesită studii suplimentare privitor la rata metabolică tumorală coroborate cu angiogeneza; cercetare de graniță între domeniile morfologice și cele funcționale metabolice respectiv nutri-genice. Această concluzie reprezintă totodată și o contribuție personală fiind menționată mai jos în secțiunea corespunzătoare.

7. Studiul nostru asupra limfocitelor ce se regăsesc în cazul în cazul EGIST TIL de linie B și T sunt identificabile pe întregul front tumoral însă de o manieră inegală preponderent în periferia frontului tumoral față de centrul tumoral.

8. Din datele obținute prin analiza digitală de imagine în cadrul celui de al treilea studiu a rezultat ca densitatea TIL (de linie T și cele de linie B) este un parametru histologic independent de indicele de proliferare și morfologia EGIST. Sunt necesare studii viitoare pentru a stabili eventuala relația între acest parametru și datele prognostic-evolutive, respectiv răspunsul terapeutic.

9. Analiza digitală de imagine efectuată asupra micromediului tumoral al EGIST demonstrează că TIL de linie B și T sunt independente de densitatea agregatelor limfoide și structurilor limfoide terțiare din cadrul EGIST, confirmat prin analiză statistică.

10. În studiul nostru am evidențiat spectrul imunofenotipic și morfologic TIL al EGIST-urilor. Principalul actor celular în răspunsul imun la prezența EGIST sunt TIL-ul de linie celulară T. Dispoziția TIL și TLS este neomogenă în EGIST relevând o discrepanță a factorilor declanșatori imuni de la o regiune tumorală la alta și de la un caz la altul.

11. Coroborând rezultatele obținute în cadrul celor trei studii efectuate a rezultat că analiza digitală de imagine este un instrument polivalent, ce poate fi utilizat în studii

diagnostice, de tip comparativ- morfologic dar și în cele investigaționale asupra unor parametri semicantitativi prin studiul tumorilor mezenchimale.

Asociat concluziilor desprinse din analiza proliferărilor de tip EGIST am contribuit la dezvoltarea temei micromediului tumoral al EGIST și al analizei digitale de imagine prin următoarele aspecte:

1. Prin analiza morfologică a întregii serii de cazuri de EGIST am pus în evidență aspecte morfologice inedite, metaplazia condroidă și celule multinucleate tumorale, aspecte ce nu au fost raportate până în prezent în alte studii. Capitolul 6, 52;54.

2. Studiul nostru demonstrează aplicabilitatea unei noi metode de analiză a micro-vascularizației intratumorale prin utilizarea ariei vasculare capilarice expusă schimburilor metabolice cu țesuturile tumorale. Metoda este inovativă atât din punct de vedere al conceptului cât și din punct de vedere al tehnologiei utilizate apelând la tehnici de patologie digitală și analiză computerizată de imagine. Capitol 7, 103-109.

3. Utilizând această metodă am demonstrat în cadrul EGIST existența unei corelații între densitatea micro-vascularizației intratumorale și rata de multiplicare tumorală, o relație de tip non-liniară tip negativă. Capitol 7, 115.

4. Prin cercetările efectuate în cadrul studiului al treilea am pus în evidență printr-o manieră modernă aspectul că densitatea TIL și TLS sunt parametri histologici independenți de rata de proliferare și de tipul histologic pentru EGIST din lotul la studiu, cu implicații asupra factorilor terapeutici imuni ce pot fi utilizați în terapia EGIST. Capitol 8, 144-145.

5. Am obținut dovezi pentru reconfirmat indirectă a principiului imunologic a descreșterii intensității răspunsului imun cu vârsta prin demonstrarea unei corelații dintre densitatea TIL de linie T în cadrul EGIST cu vârsta Capitol 8, 148-149.

6. Am demonstrat în cadrul unui studiu suplimentar existența interrelație între densitatea celulelor EGIST pozitive la ki67 (active mitotic) și vârstă. Capitol 8, 149.

Din cele expuse rezultă că atingerea obiectivelor propuse de cercetare științifică defalcate în cele trei studii au fost îndeplinite în totalitate, punând în evidență avantajul analizei digitale de imagine pentru cazuri rare sau neobișnuite. EGIST-urile sunt rar întâlnite și dificil de diagnosticat în practica curentă. Potențialul lor evolutiv și gestionarea factorilor prognostici nu sunt în prezent codificate în principal din cauza lipsei unor loturi semnificative pentru studii evolutive. Avantajul analizei digitale comparativ cu alte metode de analiză a populației limfocitare și respectiv a micro-vascularizației tumorale sunt date de

în primul rând de timpul de lucru evident mai redus față de cuantificarea manuală ce implică analiza secvențială de către unul sau mai mulți observatori.

Perspectivile cercetărilor viitoare morfologice asupra EGSIT pot să se orienteze către evidențierea unor precursori distincți între EGIST PDGFR competente față de cele deficiente având în vedere separația anatomică diferită între celule interstițiale cu imunofenotip diferit precum și către investigarea funcțională a acestor formațiuni tumorale având în vedere proprietățile regulatorii musculare locale ale celulelor Cajal. De asemenea, în acest context al micromediului tumoral analizarea răspunsului patului vascular la influența diverșilor factori vasoactivi este un subiect de interes practic, pentru a pune în evidență soluții tehnice ce pot fi exploatate ca și factori adjuvanți terapeutici sau în pregătirea preoperatorie. O altă direcție de dezvoltare sunt studiile investigaționale care să se coreleze evoluția angiogenezei sub terapie cu datele metabolice tumorale (aerobic deficiente versus cele SDH competente dar care proliferază într-un mediu cu concentrații relativ reduse pentru nutrienți).

§

Bibliografie selectivă

1. PAPHYRUS EBERS. Bull Med Libr Assoc. 1912 Jul;2(1):12.
2. Bell Charles. Surgical observations. 1817.
3. Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities. *Advances in Anatomic Pathology*. 2021 Jan;28(1):44–58.
4. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. 2014 Feb;46(2):95–104.
5. Soft Tissue and Bone Tumours [Internet]. 5th ed. [cited 2022 Jun 30]. (WHO Classification of Tumours; vol. 3). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/33>
6. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1983 Sep;7(6):507–19.
7. Herrera GA, Cerezo L, Jones JE, Sack J, Grizzle WE, Pollack WJ, et al. Gastrointestinal autonomic nerve tumors. “Plexosarcomas.” *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Aug;113(8):846–53.
8. Herrera GA, De Moraes HP, Grizzle WE, Han SG. Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma): Light and electron microscopic study confirming the origin of the neoplasm. *Digest Dis Sci*. 1984 Mar;29(3):275–84.
9. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):577–80.
10. Monabati A, Safavi M, Solhjoo F. Extragastrintestinal Stromal Tumor Presenting as Omental Cyst. *J Gastrointest Surg*. 2016 Jun;20(6):1275–7.
11. Angelo Paolo Dei Tos, Jason L. Hornick, Markku Miettinen, Ian R. Wanless, Eva Wardelmann. Gastrointestinal stromal tumour. In: *Organisation mondiale de la santé, editor. Soft tissue and bone tumours*. 5th ed. Geneva: OMS; 2020. (World health organization classification of tumours; vol. 3).
12. Qian XH, Yan YC, Gao BQ, Wang WL. Prevalence, diagnosis, and treatment of primary hepatic gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 2020 Oct 28;26(40):6195–206.
13. Goldblum JR, Folpe AL, Weiss SW. *Enzinger & weiss’s soft tissue tumors*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2019. chapter 17.
14. Rossi S, Gasparotto D, Toffolatti L, Pastrello C, Gallina G, Marzotto A, et al. Molecular and clinicopathologic characterization of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of small size. *Am J Surg Pathol*. 2010 Oct;34(10):1480–91.
15. Moldovan VT, Sajin M, Habago SD, Ali L. Type II pleuropulmonary blastoma in a fetus: case report of a rare mesenchymal mediastinal tumor and literature review. *Arch Clin Cases*. 2024;11(2):41–6.

§ §
§

Lista cu lucrările științifice publicate

1. Morphological and immunohistochemical diagnostic of extragastrointestinal stromal tumors - a 51 case series analysis. **V. T. Moldovan**, Oana Maria Patrascu, Leila Ali, Mariana Costache, Maria Sajin. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2021 Vol. 62, No. 4, 1011-1016. ISI; DOI 10.47162/RJME.62.4.13, PMID: 35673820, Factor de Impact: 0.833. <https://rjme.ro/archive/62/4/13/> (Capitol 6, 44-64);

2. Type II pleuropulmonary blastoma in a fetus: case report of a rare mesenchymal mediastinal tumor and literature review. **V. T. Moldovan**, M. Sajin, S. D. Habago, și L. Ali Arch Clin Cases, 2024, vol. 11, no. 2, pp. 41–46, BDI doi: 10.22551/2024.43.1102.10286 PMID: 38919847
<https://www.clinicalcases.eu/index.php/acc/article/view/1082> (Capitol 6, 65-70)

3. Microvessel surface correlates with ki67 expression in extragastrointestinal stromal tumours – a case series. **V. T. Moldovan**, Patrascu OM, Sajin M, Ginghina O, Eftimie L, Birceanu A, Ali L. Arch Balk Med Union. 2021;57(1):91-98. BDI.. DOI 10.31688/ABMU.2022.57.1.11. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2022.57.1.11>; (Capitol 7, 99-108).

4. Tumor Microenvironment Biomarkers Correlated with Proliferative Activity and Immune Response in Extragastrointestinal Stromal Tumors: Exploring Variations in Different Age Groups. **V. T. Moldovan**, Leila Ali, Maria Sajin. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 2024, 19(2), 233-238. BDI,
[https://www.maedica.ro/articles/2024/2/2024_19\(22\)_No2_pg233-238.pdf](https://www.maedica.ro/articles/2024/2/2024_19(22)_No2_pg233-238.pdf);
DOI <https://doi.org/10.26574/maedica.2024.19.2.233>, (Capitol 8,127-129; 145-148).

§ § §
§ §
§