

Cuprins

I.	Partea Generală.....	2
1.	Noțiuni introductive în definirea sarcoamelor de părți moi.....	2
1.1.	Factori de prognostic.....	3
1.1.1	Factori clinico-patologici.....	3
1.1.2	Clasificarea și semnificația prognostică a marginilor de rezecție chirurgicală..	4
II.	Partea Contribuții personale.....	5
1.	Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	5
2.	Studiu privind asocierea unor markeri imunohistochimici și imagistici cu prognosticul.....	5
3.	Studiu privind evaluarea factorilor de prognostic, supraviețuirea globală și mortalitatea.....	11
4.	Studiu privind analiza moleculară a sarcoamelor de părți moi prin secvențierea de generație următoare.....	21
III.	Concluzii și contribuții personale.....	26
	Bibliografie.....	30
	Lista cu lucrări publicate.....	31

I. Partea generală (Stadiul actual al cunoașterii)

1. Noțiuni introductive în definirea sarcoamelor de părți moi

Sarcoamele țesuturilor moi reprezintă un grup rar și eterogen de tumori de origine mezenchimală al căror nume derivă din cuvintele grecești “sarcos” și “oma” care înseamnă tumoră cărnosă. Ele se pot dezvolta din orice țesut conjunctiv, precum mușchi netezi sau striați, tendoane, vase de sânge, țesut adipos sau din țesutul nervos.

Estimările Societății Americane de Cancer[1] pentru sarcoamele țesuturilor moi din Statele Unite pentru 2024 sunt: aproximativ 13.590 de sarcoame noi ale țesuturilor moi vor fi diagnosticate (7.700 la bărbați și 5.890 la femei). Aproximativ 5.200 de persoane (2.760 de bărbați și 2.440 de femei) vor deceda din cauza sarcoamelor de țesut moale. Aceste statistici includ atât adulții, cât și copiii., de aceea este necesară optimizarea (personalizarea) regimului de tratament încă din stadiul inițial al bolii.

În mod ideal, cuantificarea caracteristicilor tumorilor ar fi de ajutor pentru a selecta cea mai eficientă abordare terapeutică pentru fiecare pacient diagnosticat cu neoplasm de țesuturi moi (excizie chirurgicală, chimioterapie/radioterapie neoadjuvantă/adjuvantă/paliativă). Cu toate acestea, principala problemă în acest pas este reprezentată de eterogenitatea acestor tipuri de sarcoame.

Pentru a stimula tratamentul optim (personalizat), este important să distingem tipul tumoral pe baza caracteristicilor clinico-imagistice, a diagnosticului histopatologic și imunohistochimic, precum și a diagnosticului molecular.

Sarcoamele sunt definite ca un grup diferit de tumori maligne ce derivă din celulele mezenchimale, reprezentând aproape 21% din toate cancerurile maligne solide pediatrice și mai puțin de 1% din neoplasmul solid la adulți [10].

Clasificarea histopatologică a evoluat considerabil în ultimele decenii cu ajutorul noilor tehnici de diagnostic precum imunohistochimia, microscopia electronică și analiza citogenetică. Aceste progrese au dus la reclassificarea mai multor tumori. De exemplu, rabdomiosarcomul și fibrosarcomul, subtipuri histologice comune acum 30 ani, sunt astăzi considerate rare. În locul lor, histiocitomul fibros malign este acum recunoscut a fi cel mai frecvent subtip histologic întâlnit.

Incidența sarcoamelor variază în funcție de țară și în funcție de data studiului [11] și, prin urmare, nu poate fi precizată cu exactitate. În mod similar, incidența fiecărui subtip histologic individual este neclară și sarcoamele sunt diagnosticate greșit în până la 30% din cazuri [12], prin urmare, acești pacienți diagnosticați eronat nu pot fi tratați conform ghidurilor clinice, ghiduri ce recomandă ca managementul pacienților diagnosticați cu un neoplasm țesut moale să fie efectuat de o echipă multidisciplinară dedicată. Incidența sarcoamelor de părți moi a fost dificil de estimat prin prisma naturii eterogene a acestor tip de tumori și controversele legate de clasificarea diferitelor sale subtipuri au contribuit la această dificultate.

Factori de prognostic

Factori clinicopatologici

Înțelegerea factorilor clinico-patologici care afectează prognosticul este esențială în formularea unui plan terapeutic pentru pacientul diagnosticat cu sarcom de țesut moale. Cei trei factori clinico-patologici majori care stabilesc profilul de risc pentru un anumit pacient sunt reprezentați de dimensiunea tumorii, gradul histologic și extinderea bolii (afectare ganglionară sau metastatică), așa cum se reflectă în ediția a 8-a a sistemului de stadializare AJCC. Dimensiunea tumorală este de interes în mod special, cu tumori grupate între 1-5 cm, mai mari de 5 cm, mai mari de 10 cm și mai mari de 15 cm. Pe lângă factorii anteriori, subtipul histologic precum și marginile de rezecție sunt de asemenea semnificativi, dar aceste criterii nu sunt incluse în sistemul actual de stadializare. În plus, spre deosebire de alte tumori solide, factorii care predispun la recurență locală diferă de cei care prezic metastazele la distanță și mortalitatea asociată tumorii. [74]. Cu alte cuvinte, pacienții care prezintă o constelație de factori de prognostic ce predispun la recidivă locală nu prezintă neapărat risc crescut de apariție a metastazelor la distanță sau deces asociat tumorii, precum și viceversa.

Clasificarea și semnificația prognostică a marginilor de rezecție chirurgicală

Chirurgii ar trebui să utilizeze sistemul de clasificare a rezecțiilor elaborat de UICC [75] pentru integrarea rezultatelor operatorii și a marginilor de rezecție chirurgicală.

În acest sistem, o rezecție R0 este definită ca o rezecție macroscopică completă a sarcomului cu margini chirurgicale negative microscopic. O rezecție R1 este o rezecție macroscopică completă a sarcomului cu margini chirurgicale microscopic pozitive, iar o rezecție

R2 este o rezecție macroscopică incompletă (leziune reziduală macroscopică) a sarcomului cu margini chirurgicale microscopic pozitive.

Tipul de margini microscopic pozitive este de asemenea important. De exemplu, o rezecție R1 pentru un liposarcom de grad scăzut sau o rezecție R1 după radioterapie preoperatorie în care este anticipată (și acceptată) o limită de excizie pozitivă microscopic pentru a conserva structurile esențiale are un risc relativ scăzut (mai puțin de 10%) de recidivă locală. În plus, o limită pozitivă anticipată pe o structură critică nu crește rata de recurență locală, așa cum este susținut în clasificarea TMCC.[76] Folosind acest sistem de clasificare, marginile pozitive au fost împărțite în margini pozitive în apropierea structurilor nobile, margini pozitive după o excizie neplanificată sau reexcizie și margini inadvertente pozitive. Marginile pozitive din preajma structurilor esențiale au avut rate de recidivă locală similare cu cele în care s-a realizat și excizia structurilor nobile. [77]. Pacienții supuși exciziei neplanificate, urmată de o reexcizie cu margini pozitive (adică rezecție R1) sau pacienții cu margini pozitive neprevăzute după rezecția primară prezintă un risc crescut de recidivă locală, cu rate care se apropie de 30%. Prin urmare, trebuie luat în considerare cadrul clinic specific atunci când se interpretează riscul relativ de recidivă locală după o rezecție tip R1.

II. Partea originală (Contribuții personale)

II.1 Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Sarcoamele de țesuturi moi reprezintă un grup de tumori maligne, rare, cu o incidență de aproximativ 1% din toate cancerurile la adulți. Aceste tumori prezintă o eterogenitate genetică și fenotipică considerabilă, ceea ce face dificilă diagnosticarea precisă și tratamentul eficient. Scopul acestui studiu de cercetare a pornit de la lipsa unor metode standardizate de diagnostic, a identificării unor factori de prognostic cu impact asupra ratei de răspuns la tratament, implicat asupra supraviețuirii globale și asupra mortalității.

Cercetarea își propune utilizarea medicinei de precizie și a abordărilor personalizate de tratament, bazate pe caracteristicile genetice și moleculare specifice ale sarcoamelor de țesuturi moi, îmbunătățind semnificativ prognosticul și calitatea vieții pacienților. Se anticipează că prin identificarea mutațiilor genetice și a biomarkerilor specifici, se pot dezvolta terapii direcționate, care să fie mai eficiente și cu mai puține efecte adverse comparativ cu tratamentele standard.

II.2 Materiale și metode

Studiul analitic observațional de cohortă realizat s-a desfășurat pe parcursul a șapte ani (2016-2023) în cadrul secției de Ortopedie – Traumatologie a Spitalului Universitar de Urgență București, fiind în conformitate cu Declarația de la Helsinki și aprobat de consiliul de etică (nr. 2305/2016) fiecare participant a primit un formular de consimțământ informat și a respectat normele internaționale în privința eticii și deontologiei cercetării științifice.

Principalul obiectiv al acestei analize a fost reprezentat de identificarea și monitorizarea pacienților diagnosticați cu sarcoame de părți moi primare/recurente localizate la nivelul extremităților.

În analiza statistică au fost preluate date despre pacienți precum: vârstă, sex, indicele de masă corporală, mediul de proveniență, antecedente personale patologice, antecedente heredo-colaterale. Tehnicile imagistice utilizate (RMN, CT, Angiografie, PET-CT, Spect CT) au furnizat date cu privire la extensia formațiunii tumorale, informații asupra invaziei vasculare sau osoase, afectarea ganglionară, prezența / absența determinărilor secundare. Diagnosticul de certitudine a fost pus în baza analizei buletinelor histopatologice și imunohistochimice. Detalii suplimentare au fost obținute în urma analizei genetice moleculare colectând date furnizate de secvențierea

genomică de generație următoare. Toți pacienții incluși în studiu au fost supuși unui algoritm de diagnostic clinic, imagistic și histopatologic (inclusiv în cazurile de sarcoame moi recidivate).

I. Studiu privind asocierea unor markeri imunohistochimici și imagastici cu prognosticul

I.1. Imunohistochimia combină metode histologice și biochimice cu cele imunologice pentru a identifica elemente celulare și tisulare cât mai precis posibil. În diagnosticul histopatologic, imunohistochimia utilizează criterii moleculare care permit o analiză fenotipică a diferențierii, histogenezei, apariției, clasificării și proliferării tumorilor. În plus, rolul prognostic și predictiv al unor markeri este identificat și demonstrat prin tehnicile IHC. Tehnicile IHC au îmbunătățit elaborarea unui diagnostic anatomopatologic cât mai comprehensibil, mai ales pentru tumorile cu grad scăzut de diferențiere, tumorile rare, tumorile cu malignitate incertă sau formațiunile tumorale care colorațiile uzuale nu pot preciza originea proliferării celulare primare.

Markeri imunohistochimici limfoizi

CD4 – marker comun pentru celulele T helper, este folosit pentru a clasifica și diferenția limfoamele de afecțiunile inflamatorii.

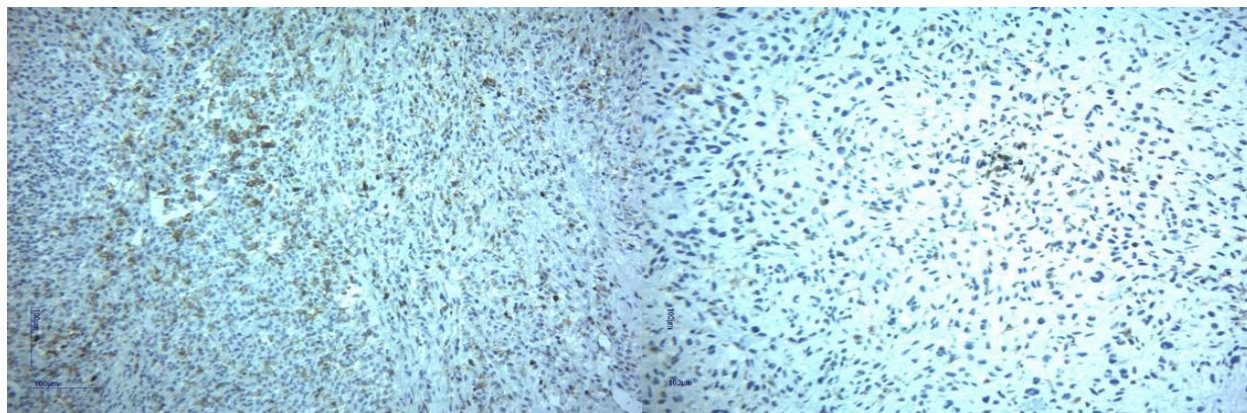


Fig. I.9 CD4 – MPNST – 20x

Fig. I.10 CD4 – mixofibrosarcom 100x

CD8 – marker pentru populația de celule T citotoxice și este recomandat pentru detectarea antigenelor specifice în țesuturile normale și neoplazice, ca adjuvant al examenului histopatologic convențional folosind colorații histochimice non-imunologice.

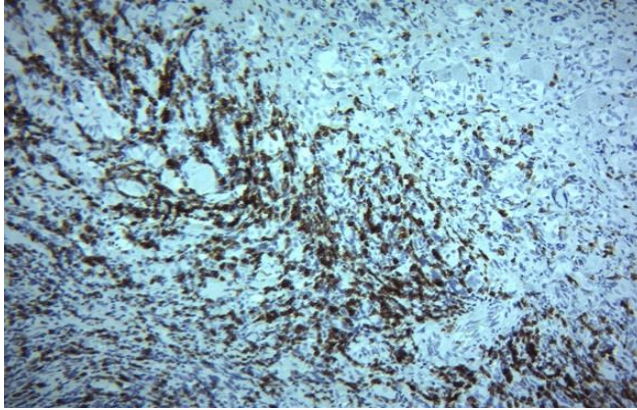


Fig. I.11 CD8 – angiosarcom 200x

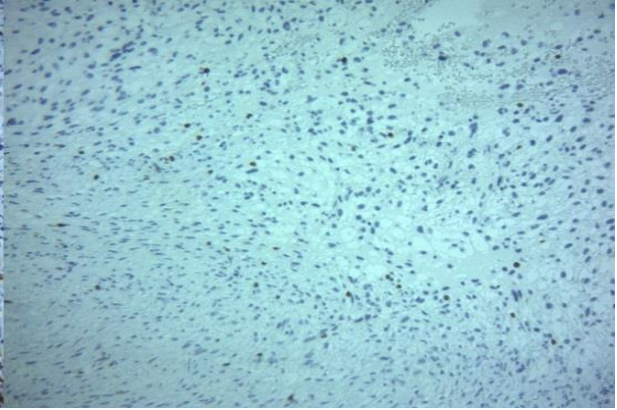


Fig. I.12 CD8 – sarcom pleomorf 200x

CD34 este o glicoproteină transmembranară de suprafață cu rol în adeziunea intercelulară și în reglarea proliferării și diferențierii celulelor.

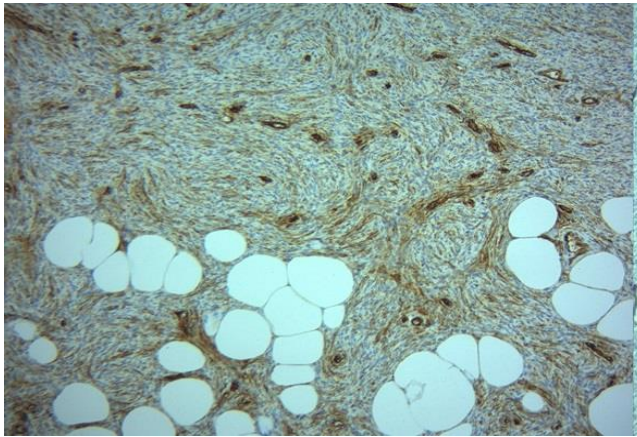


Fig. I.13 CD34 – Liposarcom 200x

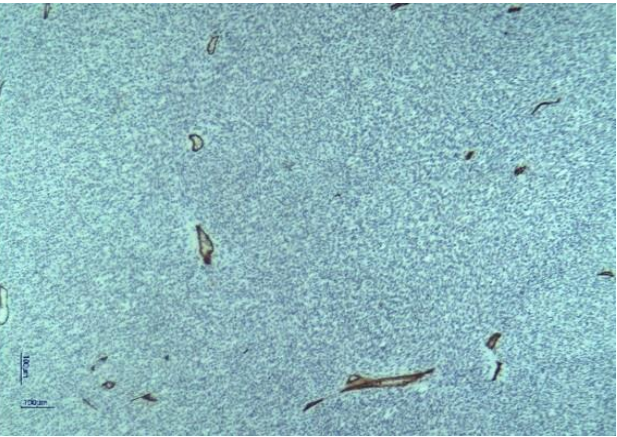


Fig. I.14 CD34 – Fibrosarcom 100x

CD44 este o proteină de adeziune a suprafeței celulare care apare în mod natural în diferite izoforme, promovează recrutarea limfocitelor în timpul răspunsurilor inflamatorii.

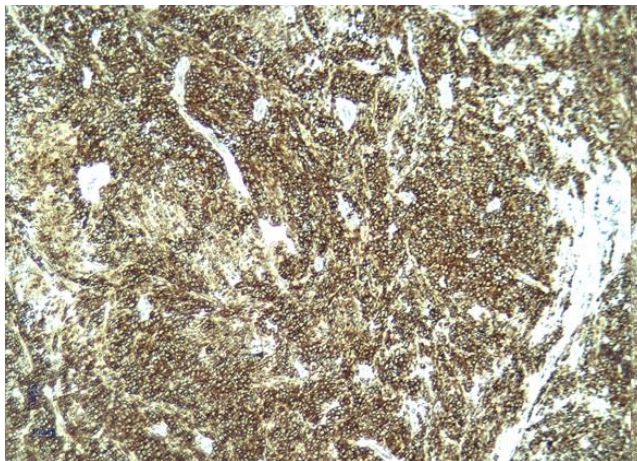


Fig. I.15 CD44 – MPNST 100x

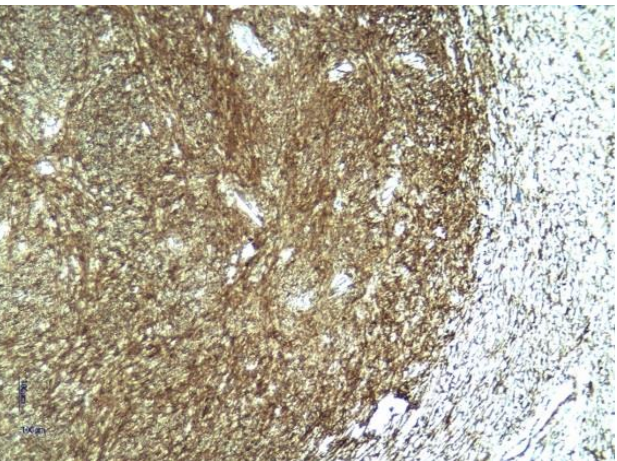


Fig. I.16 CD44 – fibrosarcom 200x

Alți markeri imunohistochimici

CD99 este exprimat de majoritatea sarcoamelor Ewing. Cu toate acestea, este exprimat într-o varietate de alte tumori: leucemie limfoblastică (100%), sarcomatoză sinovială, sarcom sinovial (80-90%), tumoră fibroasă solitară (90%), tumoră desmoplastică cu celule rotunde, condrosarcom mezenchimal, timom și în cazuri rare de rhabdomiosarcom, carcinoame.

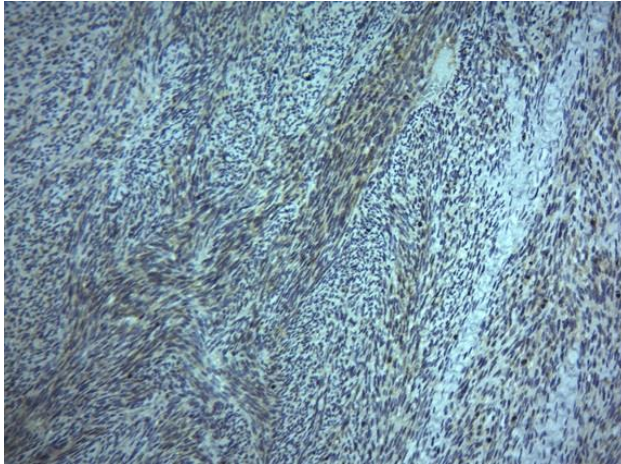


Fig. I.17 CD99 – sarcom pleomorf

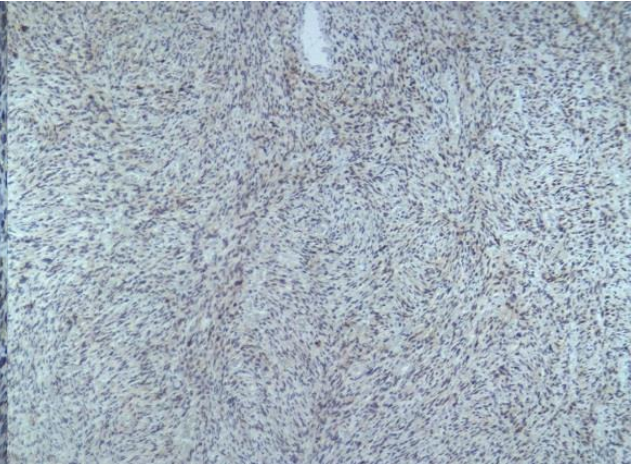


Fig. I.18 CD99 – fibrosarcom

P53 reprezintă un marker surogat util în evidențierea mutației genei TP53. Pozitivitatea nucleară puternică sau absența completă prin imunohistochimie are o corelație puternică cu prezența unei mutații, expresia scăzută până la intermediară .

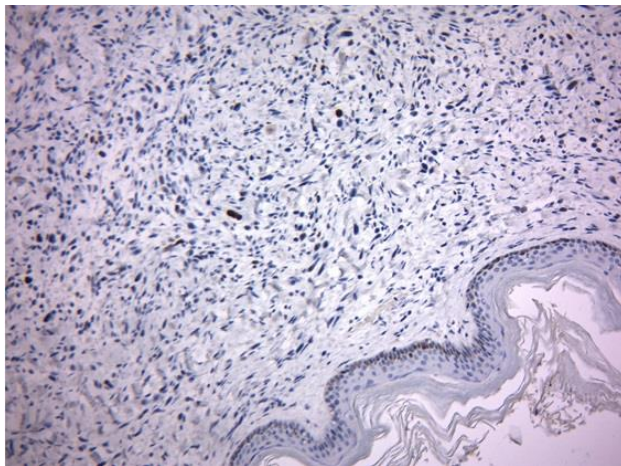


Fig. I.19 P53 –leiomiosarcom 20x

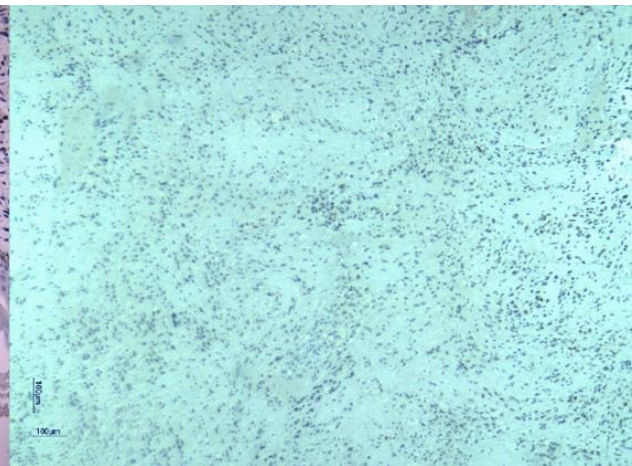
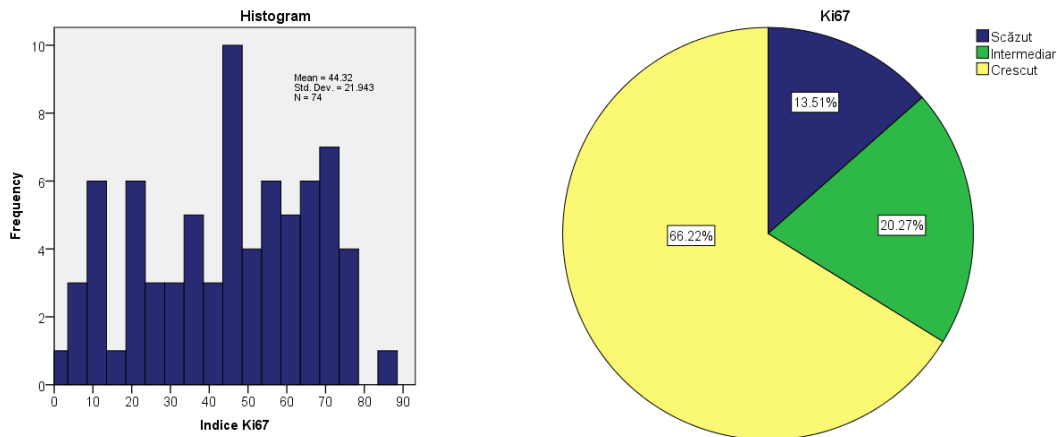


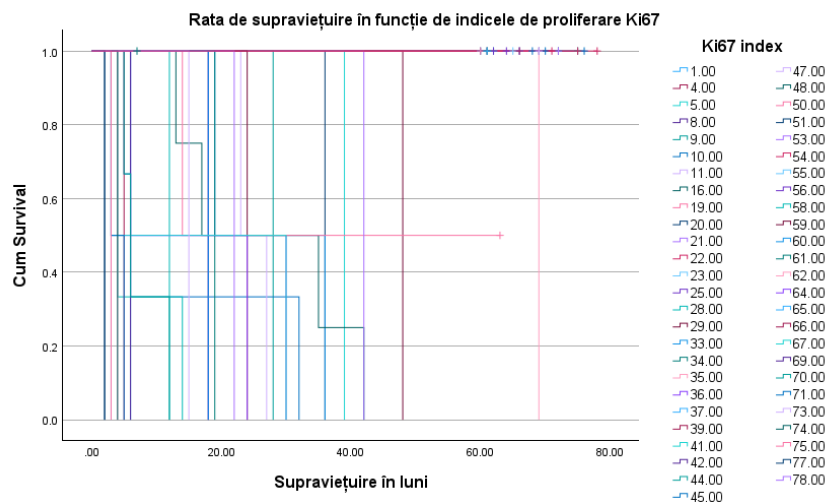
Fig. I.20p53 – mixofibrosarcom 200x

Fig. I.25: distribuția cazurilor în funcție de indicele Ki67



Indicele Ki67 a variat între 1% și 85%, având o valoare medie de 44.32% (deviația standard 21.94; CI: [39.24; 49.40]).

Fig. I.26 Rata de supraviețuire în funcție de Ki67

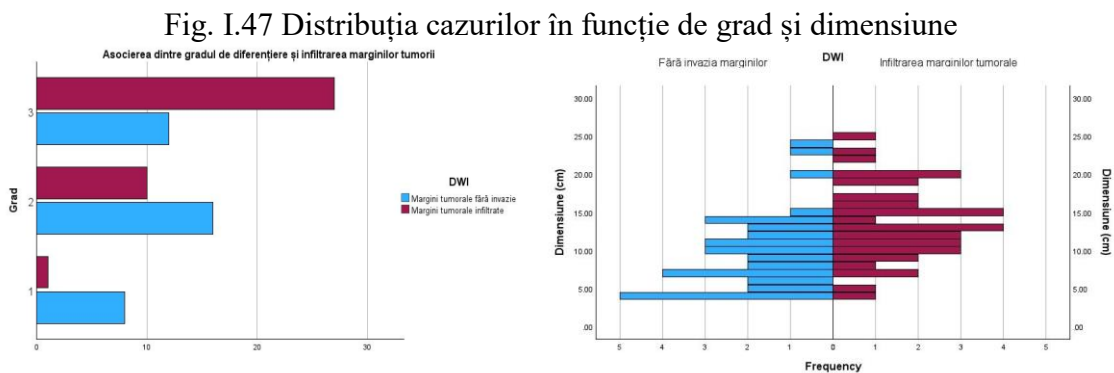


Scopul acestui studiu a fost de a clarifica semnificația prognostică a infiltratului limfocitar în sarcoamele părților moi. Pentru a analiza acest lucru, am analizat expresia limfocitelor CD4, CD8, CD34, CD44 și CD99. Statusul imun în momentul exciziei este important, dar semnificația prognostică a limfocitelor care infiltrază tumora este controversată, din cauza sistemului imun care are roluri diferite în timpul oncogenezei, astfel încât uneori nu se poate face clar distincția între invazia tumorală și prezența unui infiltrat inflamator reactiv.

Pozitivitatea markerilor **CD4**, **CD8**, **CD34** a fost asociată cu un grad de agresivitate scăzut al sarcoamelor de părți moi, fără invazia marginilor tumorii, ilustrând astfel o rată de supraviețuire mai bună în cadrul acestor pacienți. Pacienții cu mutația genei **P53** sunt predispuși la deces

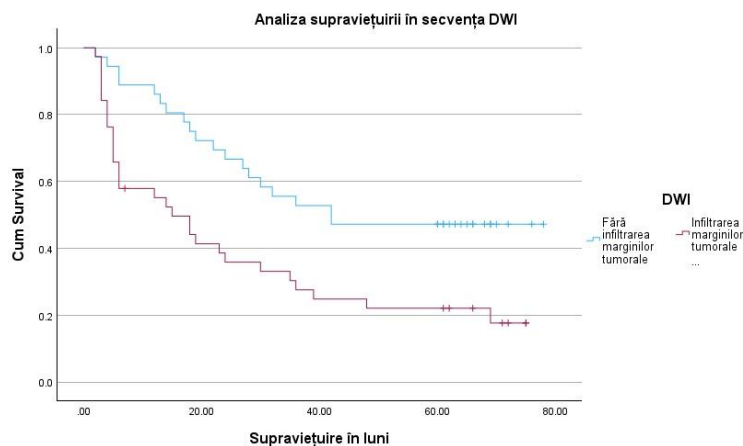
semnificativ mai frecvent și au prezentat mai un grad histologic crescut, cu infiltrarea marginilor tumorii, asociind astfel o supraviețuire globală mai scăzută comparativ cu ceilalți pacienți.

În studiul efectuat marginea tumorii a fost clasificată ca fiind infiltrată în secvența DWI dacă era imprecis delimitată sau neregulată, în timp ce marginile circumscrise, bine delimitate au fost definite ca fiind neinfiltrate. Distribuția cazurilor din lotul studiat a evidențiat o invazie a marginilor tumorale în 51% cazuri (N=38) cât și o asociere între gradul histologic și dimensiune astfel încât sarcoamele de dimensiuni mari cu grad histologic intermediar și crescut au fost asociate cu margini neregulate, infiltrative și edem peritumoral prezent.



Totodată se evidențiază o asociere între invazia marginilor tumorii și gradul histologic, astfel încât tumorile cu grad intermediar și înalt de malignizare au prezentat mult mai frecvent infiltrarea marginilor. Asupra acestui lot de pacienți a fost efectuată o analiză de supraviețuire Kaplan-Meier pentru a compara efectul/impactul pe care îl are invazia marginilor tumorii asupra supraviețuirii.

Fig.I.48 Analiza supraviețuirii în secvența DWI



Analiza statistică utilizată în datele prezentate în studiul nostru dezvăluie o rată de supraviețuire globală scăzută la 5 ani în cadrul lotului de pacienți la care a fost evidențiată infiltrarea marginilor tumorii.

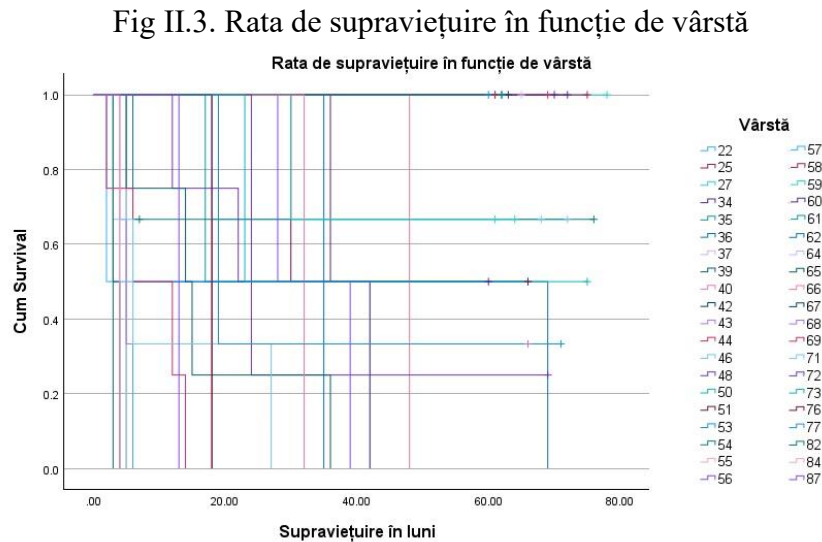
II. Studiu privind evaluarea factorilor de prognostic, supraviețuirea globală și mortalitatea

Efectul vârstei ca factor de prognostic asupra supraviețuirii globale ar putea fi explicat doar parțial din cauza diferențelor între caracteristicile formațiunii tumorale și a diferitelor metode tratament, în unele situații, suboptime. Mortalitatea mai mare în cazul pacienților vârstnici ar putea fi explicată și de prezența altor comorbidități asociate cât și de răspunsul organismului la tratamentele neoadjuvante/adjuvante.

Tabel.II.2 Rata de supraviețuire în funcție de vârstă

Analiza statistică			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	104.348	39	<.001
Breslow (Generalized Wilcoxon)	90.215	39	<.001
Tarone-Ware	96.585	39	<.001

Rata de supraviețuire în funcție de vârstă

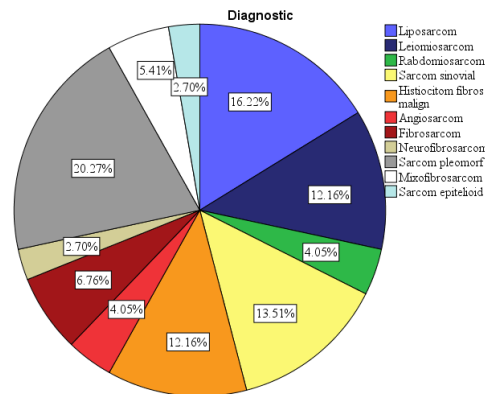


În studiul efectuat, vârsta înaintată a fost asociată cu o mortalitate mai mare conform curbei de supraviețuire Kaplan Meier. Valorile $p < 0,001$, $0,001$ și $0,001$ au sugerat că a existat o corelație semnificativă statistic între vârsta înaintată și supraviețuirea globală. Anumite subtipuri histologice prezintă un comportament diferit, ceea ce denotă că sistemele clasice de stadializare și prognostic nu pot fi aplicate asupra lor. În ultima clasificare OMS a sarcoamelor de părți moi este recunoscută importanța histotipării corecte prin încorporarea IHC în criteriile de diagnostic, și, în multe cazuri, studii genetice moleculare fiind necesare în vederea obținerii unui diagnostic cât mai precis.

În funcție de diagnostic, cazurile au avut următoarea distribuție:

- sarcom pleomorf – 20.27% din cazuri (n=15),
- liposarcom – 16.22% din cazuri (n=12),
- sarcom sinovial – 13.51% din cazuri (n=10),
- histiocitom fibros malign – 12.16% din cazuri (n=9)
- leiomiosarcom – 12.16% din cazuri (n=9),
- fibrosarcom - 6.76% din cazuri (n=5),
- mixofibrosarcom – 5.41% din cazuri (n=4),
- rabdomiosarcom – 4.05% din cazuri (n=3),
- angiosarcom - 4.05% din cazuri (n=3),
- neurofibrosarcom – 2.70% din cazuri (n=2),
- sarcom epitelioid -2.70% din cazuri (n=2).

Fig. II.7: distribuția cazurilor în funcție de diagnostic

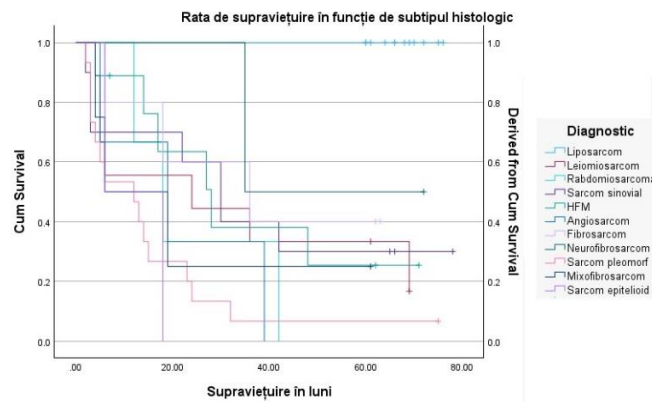


Tabel II.1 Analiza statistică a diagnosticului

Analiza statistică			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	32.964	10	<.001
Breslow (Generalized Wilcoxon)	28.149	10	.002
Tarone-Ware	30.860	10	<.001

Rata de supraviețuire în funcție de diagnostic

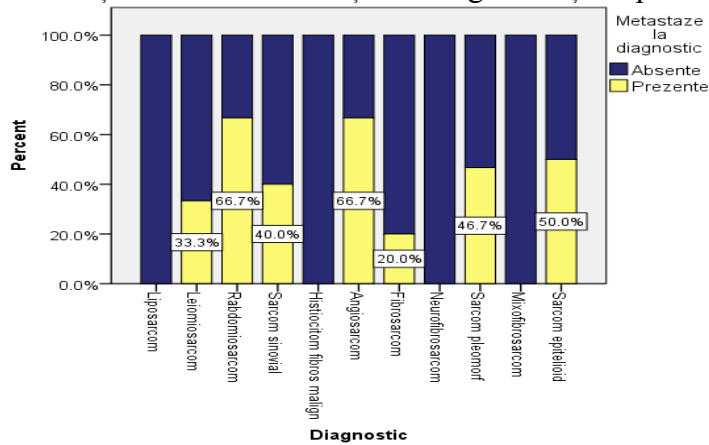
Fig.II.8 Rata de supraviețuire în funcție de subtipul histologic



În studiul efectuat, cel mai frecvent tip histologic întâlnit a fost sarcomul pleomorf (20,3%), urmat de liposarcom (16,2%) și sarcomul sinovial (13,6%). Subtipul histologic al tumorii pare a fi unul din factorii care influențează cel mai mult prognosticul. așa cum se observă prin aplicarea curbei de supraviețuire Kaplan Meier.

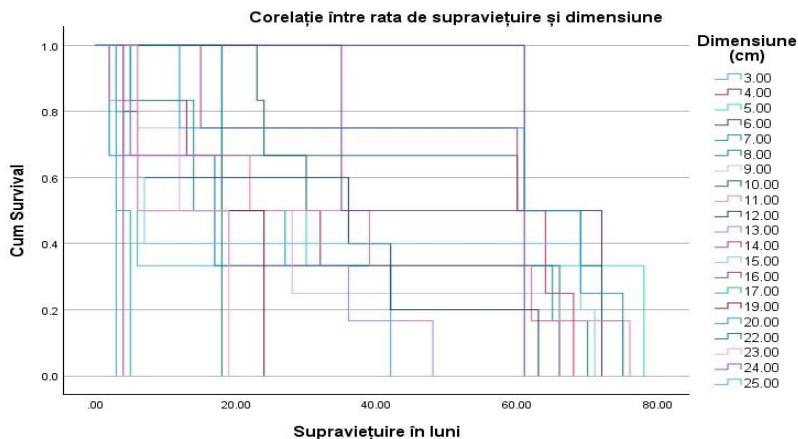
Asocierea diagnosticului cu metastazele

Fig. II.9 distribuția cazurilor în funcție de diagnostic și de prezența metastazelor



S-a remarcat că anumite subtipuri histologice au fost asociate cu o incidență mai crescută a metastazelor. În ceea ce privește dimensiunea tumorii, 83% dintre pacienți au fost diagnosticați cu o tumoră care depășea cinci centimetri în momentul diagnosticării. Studiul de supraviețuire globală indică faptul că o rată mai scăzută de supraviețuire la 5 ani și un sarcom de grad mai mare au fost asociate cu dimensiunea. Mărimea tumorii reprezintă un factor de prognostic independent raportat în literatura de specialitate. O dimensiune mai mare de 5 cm este asociată cu o supraviețuire globală mai proastă. Analiza statistică Kaplan Meier indică o rată de supraviețuire mai scăzută la 5 ani în cazul tumorilor de peste 5 cm.

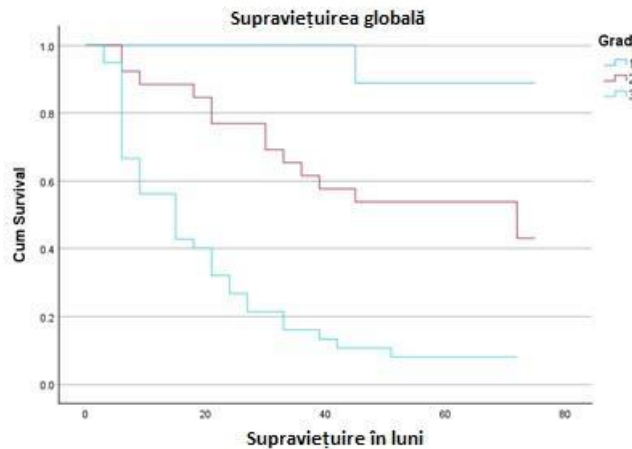
Fig. II.12 Corelația între rata de supraviețuire și dimensiune



Gradul de malignitate:

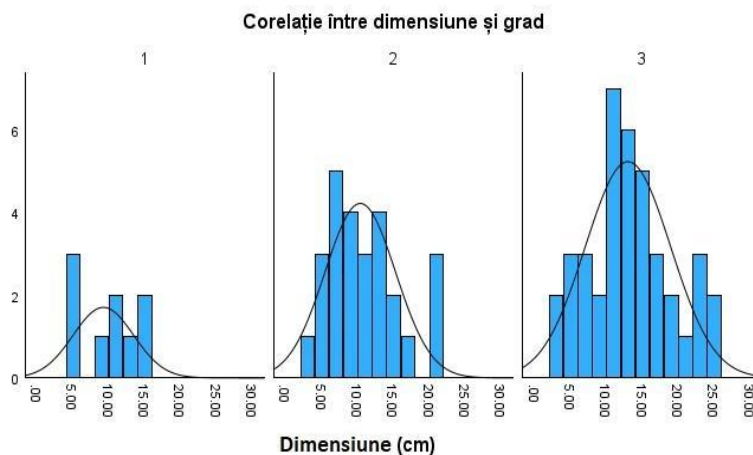
Cel mai semnificativ factor de prognostic al ratei de supraviețuire și de metastazare în sarcoamele adulte ale țesuturilor moi este gradul de agresivitate histologică. Supraviețuirea globală în rândul pacienților diagnosticați cu sarcoame de părți moi de grad scăzut este net superioară spre deosebire de pacienții care au prezentat sarcoame cu grad intermediar și crescut.

Fig. II.15 Supraviețuirea globală în funcție de grad



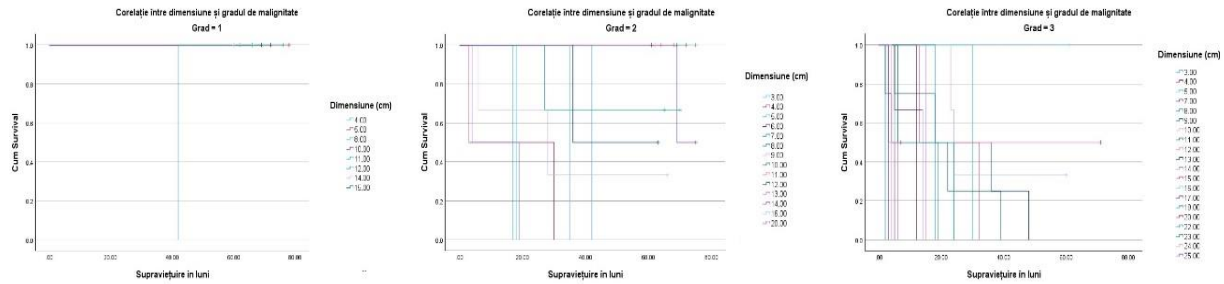
În studiul realizat 52,70% dintre sarcoame au fost de grad 3, 35,14% de gradul 2 și 12,16% de grad 1, evidențiind astfel o asocieră directă între tumorile cu grad înalt de agresivitate și tumorile de mari dimensiuni, precum și o rată de supraviețuire la 5 ani mai scăzută.

Fig. II.16 Corelație între dimensiune și grad



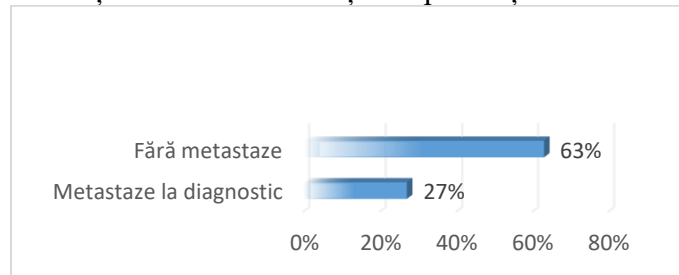
Analiza Kaplan Meier a supraviețuirii a evidențiat un prognostic mai rezervat în cazul sarcoamelor cu grad înalt de agresivitate (G3), decesul survenind în unele cazuri la mai puțin de 6 luni de la diagnostic.

Fig. II.17: corelație între dimensiune și gradul de malignitate



27% dintre pacienți prezentau boală metastatică în momentul la momentul internării în spital din cauza controlului slab al tumorii sau a tratamentului oncologic incomplet. Majoritatea metastazelor pulmonare au provenit din tumori cu grad înalt de malignitate. Cu toate acestea, o parte din pacienții cu sarcoame de grad scăzut incluși în acest studiu, au dezvoltat metastaze pulmonare. Aceste leziuni au prezentat capacitate de diseminare precoce, ceea ce denotă o asemănare între comportamentul lor biologic și leziunile de grad înalt

Tabel II.13. Distribuția cazurilor în funcție de prezența metastazelor la diagnostic



Tabel II.14. Analiza statistică a supraviețuirii globale în funcție de boala metastatică

Analiza statistică

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	29.279	1	<.001
Breslow (Generalized Wilcoxon)	22.822	1	<.001
Tarone-Ware	26.000	1	<.001

Rata de supraviețuire în funcție de boala metastatică

Fig. II.32: Supraviețuirea globală în boala metastatică

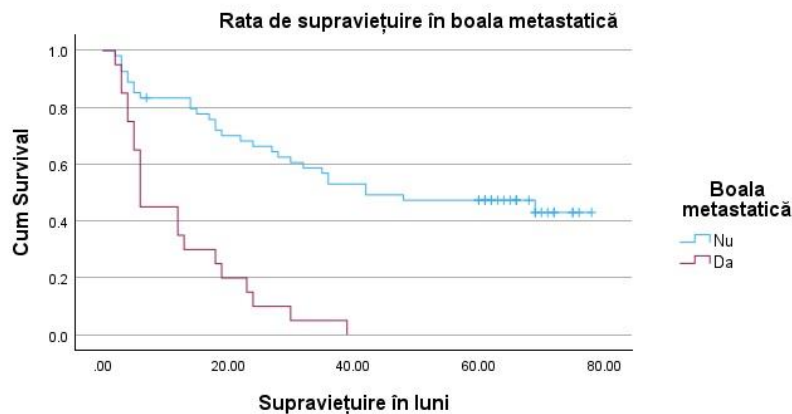
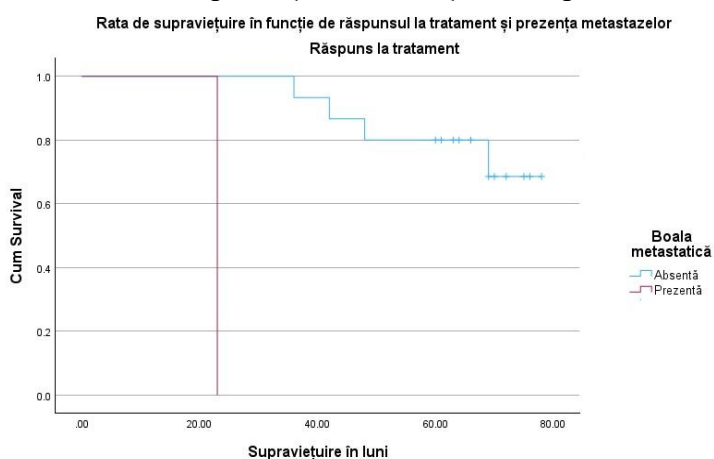


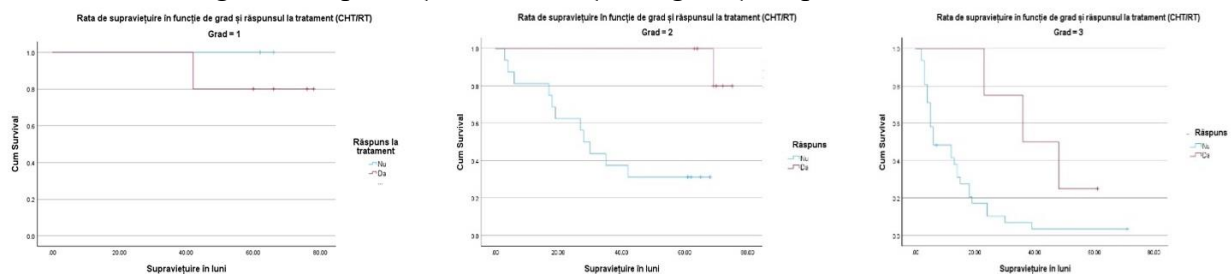
Fig.II.33 Rata de supraviețuire în funcție de răspunsul la tratament



Datele care susțin utilizarea chimioterapiei neoadjuvante în sarcomele țesuturilor moi constau în mare parte din serii retrospective mici cu foarte puține studii randomizate controlate.

Rezultatele variază între studii. În studiul prezent, chimioterapia neoadjuvantă folosită nu a avut beneficii asupra ratei de supraviețuire în cazul pacienților cu boală diseminată.

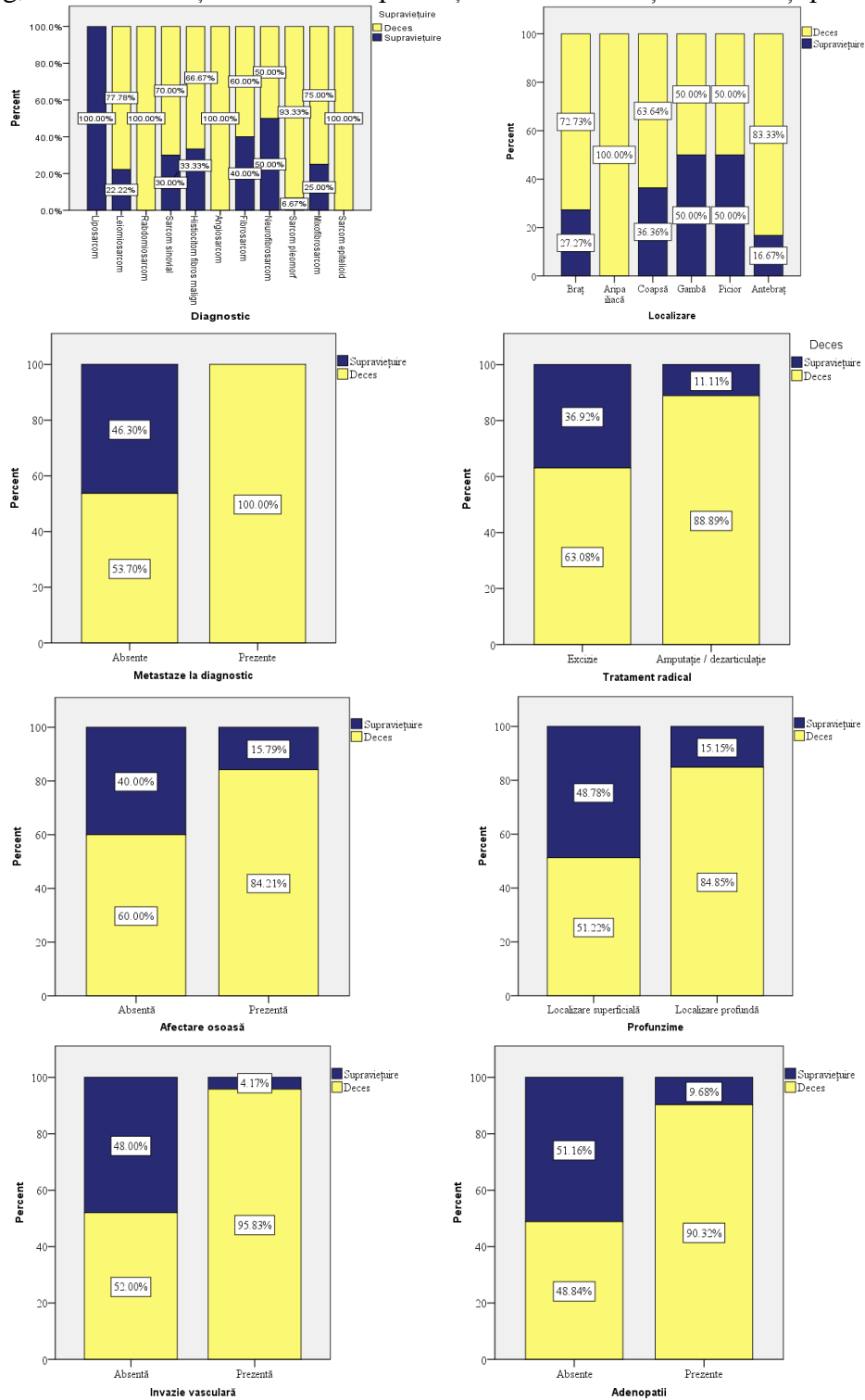
Fig.II.35 Supraviețuirea în funcție de grad și răspunsul la tratament



Analiza statistică Kaplan Meier a evidențiat o corelație între gradul de agresivitate și rata de supraviețuire a lotului studiat. Rezultatele obținute în cazul tumorilor de grad scăzut (G1) nu a relevat diferențe semnificative asupra prognosticului. În sarcoamele de grad moderat (G2) și înalt (G3) au fost constatate diferențe semnificative de supraviețuire în ceea ce privește răspunsul la tratamentul neoadjuvant

Până la momentul finalizării studiului doar 33.78% dintre pacienți supraviețuiseră (n=25), respectiv 66.22% decedaseră (n=49), decesul acestora survenind în majoritatea cazurilor în mai puțin de 3 ani de la diagnosticare/intervenție. Astfel, 40.82% dintre pacienți au decedat în mai puțin de 6 luni (n=20), 48.98% în intervalul 1-3 ani (n=24) și doar 10.20% au decedat după mai mult de 3 ani (n=5).

Fig. II.49: distribuția deceselor/supraviețuitorilor în funcție de ceilalți parametri



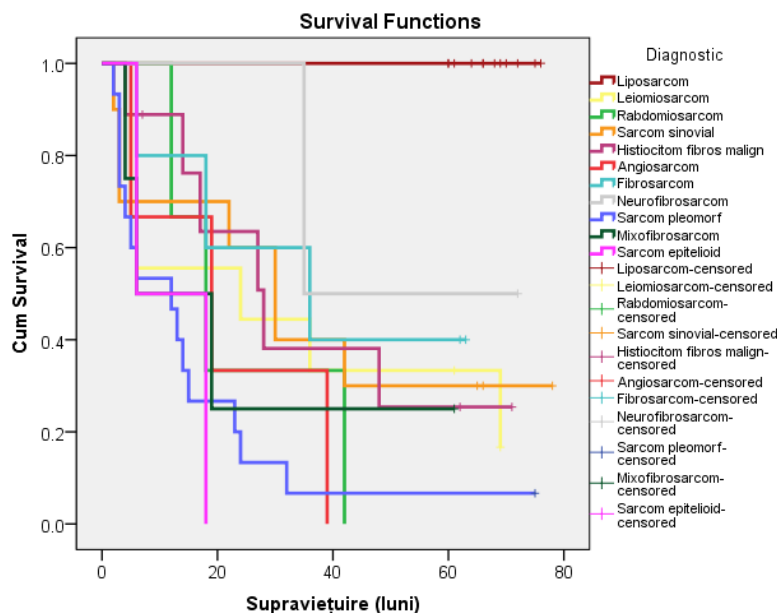
La finalul studiului, decedaseră:

- 35.14% dintre femeile din lot, respectiv 32.43% dintre bărbați;

- Toți pacienții care prezentaseră metastaze (100%) vs. 53.70% dintre cei care nu aveau metastaze;
- 88.89% dintre pacienții care necesitaseră tratament radical (vs. 63.08% dintre cei cu excizii);
- 84.21% dintre pacienții cu afectare osoasă (vs. 60% dintre cei la care nu existase afectare osoasă);
- 84.85% dintre pacienții cu localizare profundă a tumorii (vs. 51.22% dintre cei cu localizare superficială);
- 95.83% dintre pacienții cu invazie vasculară (vs. 52% dintre cei fără invazie vasculară);
- 90.32% dintre pacienții cu adenopatii (vs. 48.84% dintre cei fără adenopatii);
- 87.76% dintre pacienții cu Ki67 crescut, respectiv 40% dintre cei cu Ki67 intermediar (vs.0% dintre cei cu Ki67 scăzut);
- 76.92% dintre pacienții cu arii de necroză (vs. 54.29% cei fără necroze);
- 78.18% dintre pacienții care făcuseră chimioterapie (vs. 23.53% dintre cei fără chimioterapie);
- 81.63% dintre pacienții care avuseseră un răspuns nefavorabil la chimioterapie (vs. 31.25% dintre cei cu răspuns bun la chimioterapie);
- 62.50% dintre pacienții cu recidivă locală (vs. 65.22% dintre cei fără recidivă);
- 89.74% dintre pacienții cu grad histologic III, 50% dintre cei cu grad II, respectiv 11.11% dintre cei cu grad I.

De la momentul diagnosticului/intrării în studiu și până la deces, pacienții trăiseră între 2 și 69 luni, durata medie a supraviețuirii fiind de 17.57 luni.

Fig. II.63: curbele de supraviețuire în funcție de diagnostic

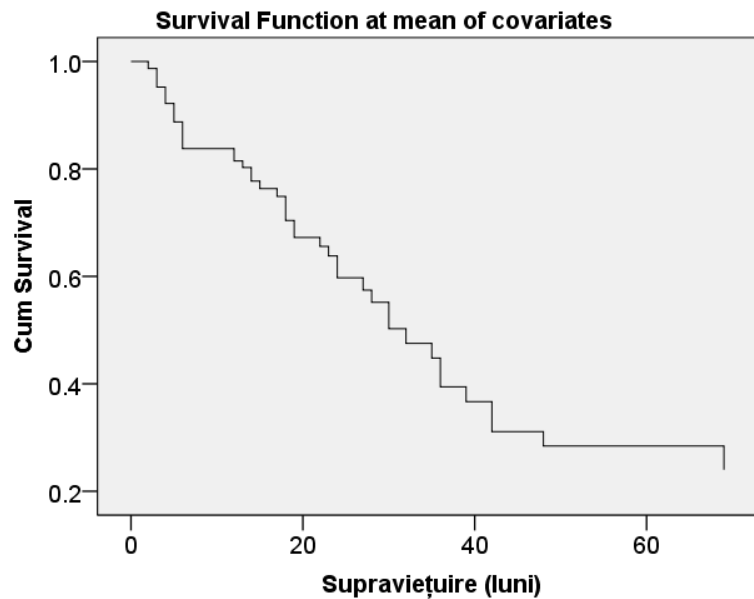


Un procent diferit de cazuri cenzurate (supraviețuitori) a fost prezent în grupurile cu sarcom pleomorf (6.7%), liposarcom (100%), sarcom sinovial (30%), histiocitom fibros malign (33.3%),

leiomiosarcom (22.2%), fibrosarcom (40%), mixofibrosarcom (25%), rabdomiosarcom (0%), angiosarcom (0%), neurofibrosarcom (50%), sarcom epitelioid (0%).

A fost efectuată o regresie Cox pentru a analiza impactul diferiților factori/parametri predictivi asupra timpului de supraviețuire a pacienților din lotul analizat. Factorii de predicție incluși au fost: **gradul histologic**, **profundimea**, respectiv **indicele Ki67**. Modelul de regresie a fost semnificativ statistic, $\chi^2=54.438$, $p\leq 0.001$.

Fig. II.64 – Analiza statistică – regresie Cox



Analiza de regresie a arătat că parametrii au fost asociați semnificativ cu timpul de supraviețuire

I. Studiu privind analiza moleculară a sarcoamelor de părți moi prin secvențierea de generație următoare

Secvențierea de generație următoare (NGS) poate oferi informații suplimentare asupra numeroaselor modificări ale genelor. Până în prezent există foarte puține date în literatură care descriu utilizarea acestei tehnici în managementul diagnostic/prognostic al sarcoamelor de părți moi. Acest studiu își propune testarea utilității secvențierii de generație următoare pentru identificarea mutațiilor care pot fi vizate în cadrul acestor tumori.

Datele de secvențiere au fost analizate manual folosind DESeq2 în urma cărora am elaborat 3 tipuri de analiză tip diagramă Vulcan și Hartă termică (mai puțin analiza C – lotul de probe analizat nu a fost suficient de cuprinzător pentru a izola gene diferite între variantele analizate).

Analiza A:

Fig. III.3: Analiza moleculară a sarcoamelor de părți moi și a lotului control



Rezultatele analizei tip Vulcan afișează expresia genelor în funcție de semnificația statistică a diferențelor de expresie, astfel:

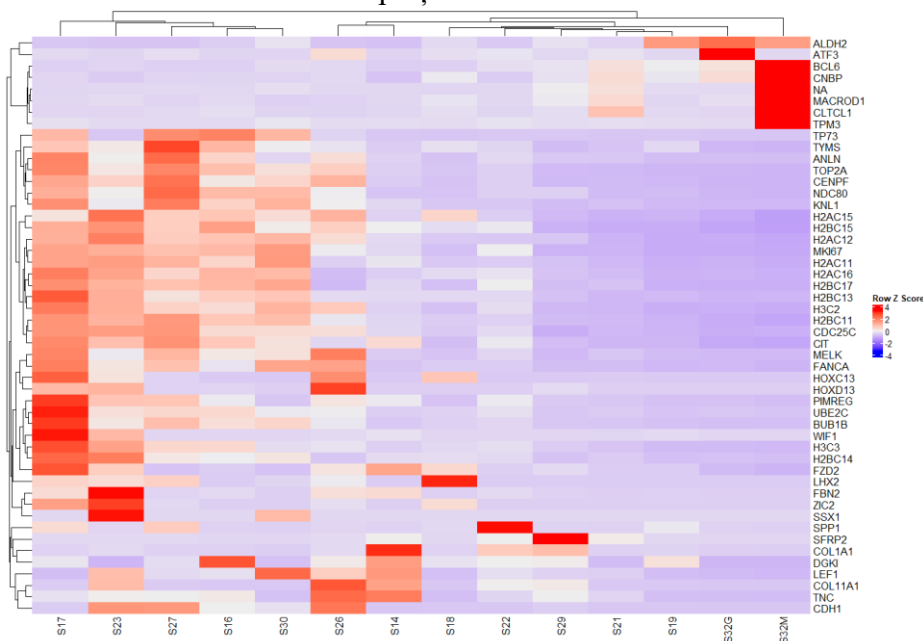
- Axa X (Log₂ Fold Change): Reprezintă gradul de schimbare a expresiei genice între cele două grupuri comparate (tumori vs. control). Valorile pozitive indică gene supreglate (exprimate mai mult în tumori), iar valorile negative indică gene subreglate (exprimate mai puțin în tumori).

- Axa Y (Log10 Adjusted p-value): Reprezintă semnificația statistică a schimbărilor de expresie. Cu cât valoarea este mai mare, cu atât schimbarea de expresie este mai semnificativă din punct de vedere statistic.
- Liniile punctate determină niște cadrane pe care le putem folosi ca zone de determinare a semnificației statistice cât și a nivelului de exprimare. Toate genele de deasupra liniei intrerupte orizontale sunt suficient de semnificative dpdv. statistic ($p < 0.05$) iar toate genele situate lateral de liniile intrerupte verticale sunt suficient de diferit exprimate între cele doua grupuri comparate (FoldChange < -5 sau > 5)

Genele situate în extremitățile graficului (stânga și dreapta sus) sunt cele mai relevante, fiind atât semnificativ diferite statistic, cât și cu o schimbare mare de expresie.

Astfel, genele cele mai supraexprimate în urma analizei A (sarcoame vs. lot control) au fost: TOP2A, TNC, BUB1B, MKI67, NDC80, MELK, FBN2, TP73, SSX1, ZIC2, COL11A1, HOXC13, WIF1, LHX2, HOXD13.

Fig. III.4 Expresia și gruparea celor mai bune 50 gene exprimate diferit Sarcoame de părți moi versus lot control



Rezultatele analizei tip hartă termică afișează nivelurile de expresie ale genelor într-un format matricial, unde fiecare celulă a matricii reprezintă nivelul de expresie a unei gene într-o probă specifică. Roșu indică o expresie genică mai mare, în timp ce albastrul indică o expresie genică mai mică. Intensitatea culorii reflectă nivelul de expresie.

- De menționat este că acest grafic afișează expresia genă cu genă, pentru toate probele însă doar după ce a fost realizată comparația prin analiza diferențială (Tumori vs Control)
- Liniile de deasupra și din stânga graficului încearcă să grupeze probele și genele în funcție de asemănarea lor.
- Ajută la vizualizarea diferențelor de expresie între multiple probe simultan. Permite identificarea grupurilor de gene cu expresie similară și observarea pattern-urilor de expresie specifice anumitor condiții sau tipuri de tumori.

Expresia și gruparea celor mai bune 50 gene exprimate diferit evidențiază prezența BCL6, CNBP, NA, MACROD1, CLTCL1, TPM3, SSX1, SPP1, COL1A1, LHX2, PIMREG, FANCA, MELK, CDC25C, HOXD13, MKI67.

Analiza B

Fig. III. 3.5: Analiza moleculară a leiomiosarcomului și a lotului control

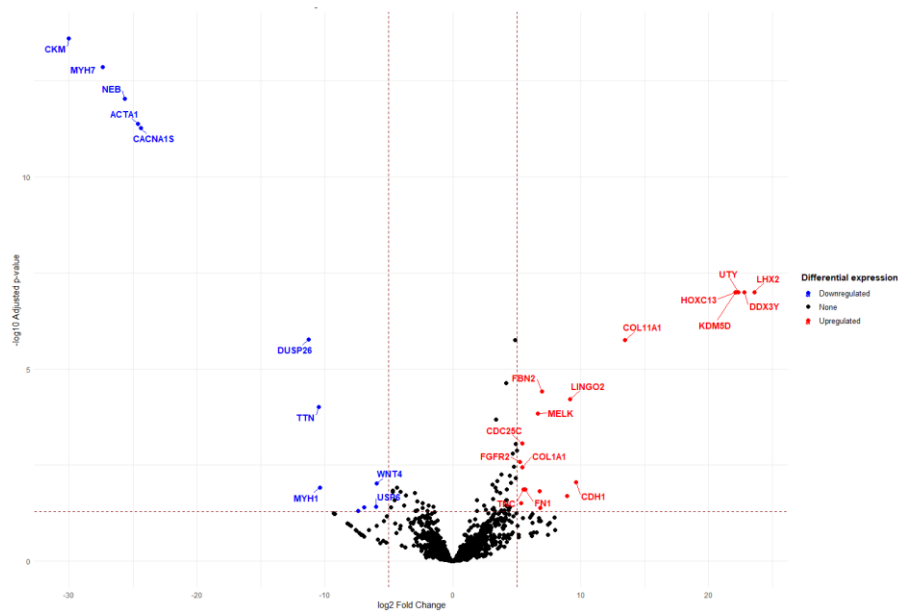
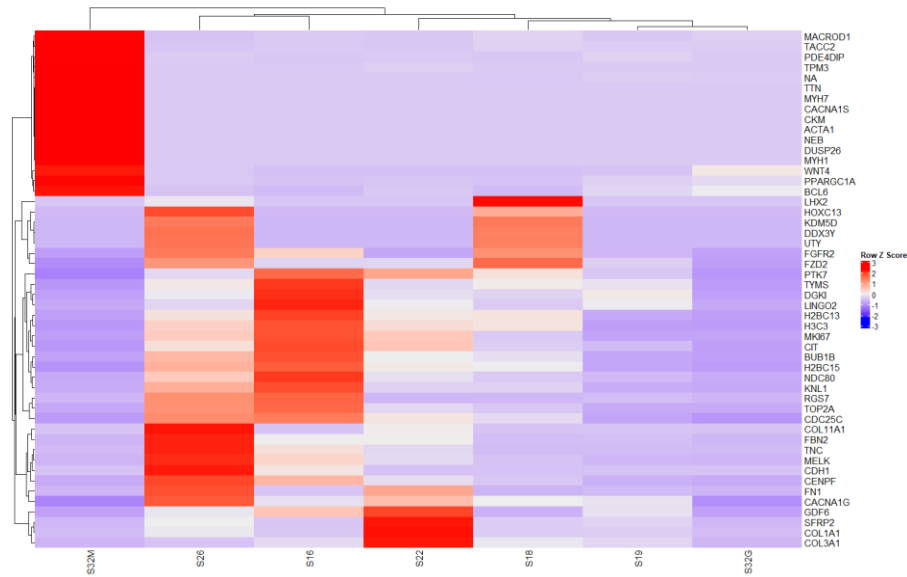


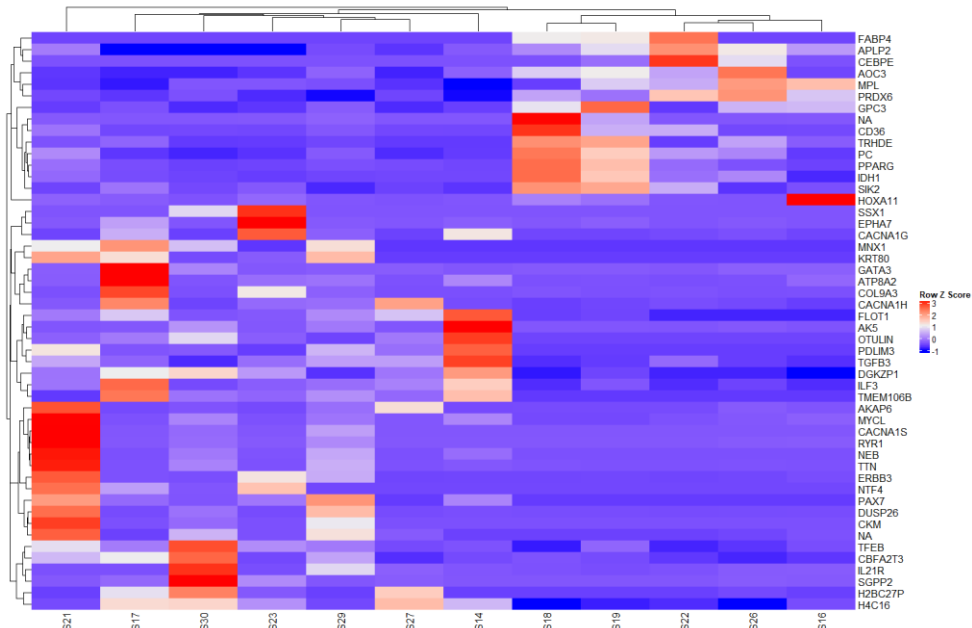
Fig. III.6 Expresia și gruparea celor mai bune 50 gene exprimate diferit Leiomiosarcom versus lot control



Rezultatele analizei B – leiomiocarcom vs. lot control evidențiază supraexpresia FN1, CDH1, FGFR2, CDC25C, MELK, LINGO2, FBN2, COL11A1, KDM50, HOXC13, UTY, LHX2, DDX3Y, HOXC13. Supraexpresia celor mai diferite gene a fost evidențiată prin prezența MACROD1, TACC2, PDE4DIP, TPM3, NA, TTN, MYH7, CACNA1S, CKM, ACTA1, UTY, FGFR2, PTK7, TOP2A, KNL1.

Analiza C

Fig. III.6 Expresia și gruparea celor mai bune 50 gene exprimate diferit Leiomiocarcom versus alte sarcoame de părți moi



Supraexpresia celor mai diferite gene în analiza C a fost AKAP6, MYCL, CACNA1S, RYR1, NEB, HOXA11, NA, CD36, MYNX1, KRT80, IL21R.

În timp ce literatura de specialitate a asociat COL1A::PDGFB cu dermatofibrosarcom protuberans (DFSP), constatările noastre au evidențiat prezența mutației COL1A2::COL1A1 la un pacient cu fibromatoză de tip desmoid. Această descoperire sugerează o potențială legătură între diferitele fuziuni de gene legate de colagen și tipuri distincte de fibromatoză, leziune precursoră a fibrosarcomului. De asemenea, am remarcat prezența mutației SS18::SSX1 la un pacient diagnosticat cu sarcom sinovial (proba tumorală a fost obținută de la o femeie de 34 de ani care a fost diagnosticată cu o masă palpabilă de dimensiuni mari (123/101/86 mm) localizată la nivelul compartimentului posterior al coapsei. Examenul HP și IHC a evidențiat prezența unui sarcom sinovial bifazic pentru care conduita terapeutică a fost reprezentată de chimio/radioterapie neoadjuvantă urmată de excizia chirurgicală a tumorii, ulterior chimioterapie adjuvantă.

Concluzii și contribuții personale

Concluziile tezei de doctorat

Acest studiu efectuat a pus bazele teoretice ale cercetării, subliniind importanța studierii sarcoamelor de țesuturi moi din perspectiva oncologiei moderne. Motivația alegerii temei este legată de necesitatea unei înțelegeri mai profunde a mecanismelor patogenice și a diversității clinice, imagistice, histopatologice, genetice și moleculare a acestor neoplazii, cu scopul de a dezvolta terapii inovatoare și de a optimiza prognosticul pacienților.

Studiul de cercetare s-a finalizat prin elaborarea unor rezultate și concluzii susținute în urma prelucrării datelor statistice.

Obiectivele de cercetare științifică propuse au fost îndeplinite, astfel încât în urma studiilor efectuate am putut genera un model de predictibilitate a comportamentului anumitor sarcoame de părți moi. Analiza datelor a făcut posibilă evidențierea celor mai importanți factori de prognostic implicați în supraviețuirea globală evaluând totodată riscul de apariție a metastazelor sau a determinărilor secundare. Markerii imunohistochimici analizați au fost corelați cu prognosticul astfel;

Ki67 - evaluarea indicelui proliferativ s-a corelat din punct de vedere statistic cu un prognostic nefast.

Pozitivitatea markerilor **CD4**, **CD8**, **CD34** a fost asociată cu un grad de agresivitate scăzut al sarcoamelor de părți moi, fără invazia marginilor tumorii, ilustrând astfel o rată de supraviețuire mai bună în cadrul acestor pacienți

Pacienții cu mutația genei **P53** sunt predispuși la deces semnificativ mai frecvent și au prezentat mai un grad histologic crescut, cu infiltrarea marginilor tumorii, asociind astfel o supraviețuire globală mai scăzută comparativ cu ceilalți pacienți. (capitol – studiu privind

Analiza statistică utilizată în datele prezentate în studiul nostru dezvăluie o rată de supraviețuire globală scăzută la 5 ani în cadrul lotului de pacienți la care a fost evidențiată infiltrarea marginilor tumorii. (capitol - studiu privind infiltrarea marginilor tumorale în secvența **DWI**).

Cu privire la factorii de prognostic în funcție de caracteristicile pacientului analiza descriptivă a lotului studiat nu a relevat o corelație semnificativ statistică cu privire la anumite caracteristici (IMC, AHC, istoricul unui traumatism local sau prezența comorbidităților asociate) și rata de

supraviețuire la 5 ani având în vedere numărul restrâns de pacienți. Vârsta înaintată a fost asociată cu o mortalitate mai mare.

Subtipul histologic al tumorii pare a fi unul din factorii care influențează cel mai mult prognosticul. În studiul nostru, prognosticul pentru liposarcom a fost în general mai bun. S-a remarcat că anumite subtipuri histologice au fost asociate cu o incidență mai crescută a metastazelor, astfel, cel mai adesea au prezentat metastaze: *rabdiosarcomul* și *angiosarcomul*, ambele în 66.7% din cazuri. Subtipul histologic și prezența metastazelor există o asociere semnificativă statistic. Studiul de supraviețuire globală indică faptul că o rată mai scăzută de supraviețuire la 5 ani și un sarcom de grad mai mare au fost asociate cu dimensiunea.

27% dintre pacienți prezentau boală metastatică în momentul la momentul internării în spital. Analiza supraviețuirii evidențiază un prognostic nefast pentru pacienții aflați în stadiul final precum și răspunsuri diferite la tratament pentru fiecare subtip tumoral. Celor mai mulți dintre pacienți, adică 76.39%, li s-a administrat chimioterapie neoadjuvantă. În sarcoamele de grad moderat (G2) și înalt (G3) au fost constatate diferențe semnificative de supraviețuire în ceea ce privește răspunsul la tratamentul neoadjuvant. Tratamentul radical a fost efectuat considerabil mai frecvent în cazul pacienților care prezentau afectare osoasă (21.05%)

Recidiva locală a fost diagnosticată la 34.29% dintre pacienți (n=24). Menționăm faptul că aproximativ 25% dintre pacienți s-au prezentat în clinica noastră având deja recidivă locală diagnosticată clinic și imagistic în alte servicii. S-a observat o incidență considerabil mai crescută a invaziei vasculare precum și a adenopatiilor în cazul pacienților cu recidivă locală.

Până la momentul finalizării studiului doar 33.78% dintre pacienți supraviețuiseră (n=25), decesul acestora survenind în majoritatea cazurilor în mai puțin de 3 ani de la diagnosticare/intervenție. La finalul studiului, decedaseră: toți pacienții care prezentaseră metastaze (100%) vs. 53.70% dintre cei care nu aveau metastaze, 88.89% dintre pacienții care necesitaseră tratament radical 87.76% dintre pacienții cu Ki67 crescut, respectiv 40% dintre cei cu Ki67 intermediar (vs.0% dintre cei cu Ki67 scăzut. S-a remarcat că a crescut mortalitatea în cazul pacienților cu grad tumoral mai mare. Pacienții cu liposarcom se deosebesc semnificativ de ceilalți pacienți, au supraviețuit semnificativ mai mult. Deși diferențele nu au fost semnificative statistic, pe grafic se pot observa că anumite diagnostice au avut distribuții de supraviețuire cu diferențe notabile comparativ cu alte diagnostice, de ex sarcomul epitelioid a avut 0% supraviețuitori, iar perioada de timp până la decesul pacienților a fost foarte scurtă comparativ cu a celorlalți pacienți (sub 20 luni)).

Datele generate de Illumina DRAGEN ARN au identificat un număr semnificativ de variante în toate probele, dintre care majoritatea erau SNP-uri - Polimorfism uninucleotidic (95,4%). Fluxul de lucru a evidențiat, de asemenea, un număr de inserții/deleții homozigote și heterozigote (4,6%). Fuziunile COL1A2::COL1A1, SF3B1::NOM1 și SS18::SSX1 au fost identificate atât de DRAGEN, cât și de conducta de aliniere ARN-Seq, ceea ce sugerează o încredere ridicată în detectarea acestor evenimente de fuziune . (capitol Studiu privind analiza moleculară a sarcoamelor de părți moi prin secvențierea de generație următoare

Directii de cercetare

- Necesitatea identificării și utilizării unor noi markeri imunohistochimici cu impact asupra prognosticului.
- Evaluarea extensiei sarcoamelor de părți moi prin secvența DWI, ADC, DCE și impactul acestora asupra supraviețuirii globale.
- Secvențierea genomică de ultimă generație va fi deosebit de utilă pentru o mai bună stratificare a subtipurilor de sarcoame care prezintă cea mai mare complexitate genomică și eterogenitate, inclusiv sarcoame nediferențiate
- Viitorul evaluării gradului de malignitate : grade-ingul molecular
- Combinarea biomarkerilor actuali bazați pe NGS cu descoperiri emergente, cum ar fi scorurile TLS (scor de liză tumorală), va fi necesară pentru o predicție mai precisă a răspunsului inhibitorului punctului de control imun în sarcoame Profilul molecular este folosit deja de rutină ca factor de predictibilitate în evaluarea prognosticului pacienților diagnosticați cu cancere epiteliale (ex în cancere de sân) unde sunt folosite teste de expresie genetică care sunt utilizate pentru a stratifica riscul pacienților și pentru a ghida terapia adjuvantă.
- În prezent, chimioterapia pentru pacienții cu boală locală avansată sau boală metastatică are eficacitate limitată. Identificarea anomaliilor moleculare pentru care medicamentele cu molecule mici (terapia țintită) sunt disponibile sau pot fi dezvoltate este esențială pentru îmbunătățire rezultatelor la acești pacienți

Contribuții personale

Contribuțiile mele personale la această cercetare au fost esențiale în atingerea obiectivelor propuse și în avansarea cunoștințelor în tratamentul sarcoamelor de țesuturi moi. Rezultatele obținute în această teză vor avea un rol în proiectarea viitoarelor studii clinice în vederea optimizării unui management diagnostic și terapeutic cât și prezicerea comportamentului anumitor entități tumorale în vederea îmbunătățirii ratei de supraviețuire și a prognosticului în cazul sarcoamelor de părți moi.

Având în vedere că datele statistice referitoare la incidența, prevalența, ratele de supraviețuire și mortalitate pentru această patologie nu au fost studiate la nivel național, scopul acestei lucrări de cercetare a fost de a elabora o bază de date unică având în vedere adresabilitatea în continuă creștere a acestor pacienți în cadrul clinicii de Ortopedie – Traumatologie – Spitalul Universitar de Urgență București. (Subcapitol – evaluarea factorilor de prognostic în funcție de caracteristicile pacientului).

Prin studiul unor markeri imunohistochimici limfocitari (CD4, CD8, CD34) am evidențiat faptul că pozitivitatea lor a reprezentat un factor de prognostic pozitiv, și, de asemenea, pot preconiza o rată de supraviețuire crescută în rândul acestor pacienți deschizând astfel noi direcții de cercetare asupra altor markeri (capitol – studiu privind asocierea unor markeri imunohistochimici cu prognosticul).

Ca urmare a elaborării acestei baze de date, am putut analiza ratele de supraviețuire și deces în urma factorilor de prognostic urmăriți, creând astfel un protocol de diagnostic (imagistic, histopatologic și imunohistochimic) ce au optimizat conduita terapeutică individualizată, specifică fiecărei entități tumorale și adaptată în funcție de caracteristicile pacientului. (subcapitol rate de supraviețuire și mortalitate).

Cercetarea doctorală a inclus și o analiză moleculară a pacienților din lotul studiat, cercetare unică la nivel național, cu rezultate promițătoare în ceea ce privește managementul diagnostic și terapeutic în cadrul acestei patologii, finanțarea fiind obținută în mare parte din fonduri proprii și în urma câștigării unui grant de cercetare în cadrul școlii doctorale. (capitol Studiu privind analiza moleculară a sarcoamelor de părți moi prin secvențierea de generație următoare).

Bibliografie selectivă

1. <http://www.cancer.org/cancer/sarcoma-adultsofttissuecancer/detailedguide/sarcoma-adult-soft-tissue- cancer-key-statistics>
2. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (<http://www.seer.cancer.gov>).
3. Zahm SH, Fraumeni JF Jr. The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin Oncol.* 1997; 24:504–14. pmid:9344316
4. Mastrangelo G, Fadda E, Cegolon L, et al. A European project on incidence, treatment, and outcome of sarcoma. *BMC Public Health.* 2010;10:188. pmid:20384990
5. Mandard, Anne-Marie, et al. "Prognostic factors in soft tissue sarcomas. A multivariate analysis of 109 cases." *Cancer* 63.7 (1989): 1437-1451.
6. Kainhofer, V., et al. "The width of resection margins influences local recurrence in soft tissue sarcoma patients." *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 42.6 (2016): 899-906.
7. Gundle, Kenneth R., et al. "Analysis of margin classification systems for assessing the risk of local recurrence after soft tissue sarcoma resection." *Journal of Clinical Oncology* 36.7 (2018): 704-709.
8. Sambri A, Caldari E, Fiore M, Zucchini R, Giannini C, Pirini MG, Spinnato P, Cappelli A, Donati DM, De Paolis M. Margin Assessment in Soft Tissue Sarcomas: Review of the Literature. *Cancers (Basel).* 2021 Apr 2;13(7):1687. doi: 10.3390/cancers13071687. PMID: 33918457; PMCID: PMC8038240.

Lista cu lucrări publicate:

Enhancing Diagnosis and Prognosis by Assessing the Clinical, Morphological, and Behavior Aspects in Soft Tissue Sarcomas

– **Serban B**, Popa M, Cursaru A, et al. (July 07, 2024) Enhancing Diagnosis and Prognosis by Assessing the Clinical, Morphological, and Behavior Aspects in Soft Tissue Sarcomas. *Cureus* 16(7): e64025. doi:10.7759/cureus.64025 (<https://www.cureus.com/articles/265485-enhancing-diagnosis-and-prognosis-by-assessing-the-clinical-morphological-and-behavior-aspects-in-soft-tissue-sarcomas#!/>) Impact factor 1.2

Practical management of renal cell carcinoma: integrating current approaches with advances in bone metastasis treatment (Eremia, I. A., **Serban, B.**, Popa, M., Iancu, A., Nica, S., & Cirstoiu, C. (2024). Practical management of renal cell carcinoma: integrating current approaches with advances in bone metastasis treatment. *EFORT open reviews*, 9(6), 488–502. <https://doi.org/10.1530/EOR-23-0178>) Impact Factor: 4.3 (<https://eor.bioscientifica.com/view/journals/eor/9/6/EOR-23-0178.xml>)

Implications of oral dysbiosis and HPV infection in head and neck cancer: from molecular and cellular mechanisms to early diagnosis and therapy Constantin, M., Chifiriuc, M. C., Mihaescu, G., Vrancianu, C. O., Dobre, E. G., Cristian, R. E., Bleotu, C., Bertesteanu, S. V., Grigore, R., **Serban, B.**, & Cirstoiu, C. (2023). Implications of oral dysbiosis and HPV infection in head and neck cancer: from molecular and cellular mechanisms to early diagnosis and therapy. *Frontiers in oncology*, 13, 1273516. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1273516> <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1273516/full> Impact factor 3.5

Local recurrence management of extremity soft tissue sarcoma **Serban B**, Cretu B, Cursaru A, Nitipir C, Orlov-Slavu C, Cirstoiu C. Local recurrence management of extremity soft tissue sarcoma. *EFORT Open Rev.* 2023 Aug 1;8(8):606-614. doi: 10.1530/EOR-23-0095. PMID: 37526250; PMCID: PMC10441250. (<https://eor.bioscientifica.com/view/journals/eor/8/8/EOR-23-0095.xml>) Impact factor 4.3

Survival prognostic factors and molecular aspects in extremity soft tissue sarcoma" **Journal of Mind and Medical Sciences** (*JMMS, J Mind Med Sci*) **Bogdan Serban**, Eugen Radu, Adrian Cursaru, Bogdan Stefan Cretu, Sergiu Andrei Iordache, Madalina Cirnu, Cosmin Florentin Niculae, Cătălin Florin Cîrstoiu – în curs de publicare – oct. 2024 (<https://scholar.valpo.edu/jmms/>) – Impact factor 1.6