

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

ANUL UNIVERSITAR 2023

TEZĂ DE DOCTORAT

Corelațiile studiilor clinico-imagistice și morfo-genetice în evaluarea prognosticului și diagnosticul precoce al gliomelor

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de Doctorat: **Prof. Univ. Dr. Mariana Așchie**

Doctorand: **Orășanu Cristian Ionuț**

CUPRINS

ABREVIERI	12
INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. Anatomia și histofiziologia sistemului nervos central	23
1.1. Anatomia sistemului nervos central	23
1.2. Histofiziologia sistemului nervos central	33
2. Stadializare, aspecte imagistice, histopatologice și genetice ale gliomelor	39
2.1 Clasificarea și gradarea OMS a gliomelor	39
2.2. Gliome difuze ale adultului	41
2.3. Gliome difuze de grad scăzut ale populației pediatrice	48
2.4. Gliome difuze de grad înalt ale populației pediatrice	50
2.5. Gliome astrocitare circumscrie	52
3. Managementul gliomelor sistemului nervos central	59
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	75
4. Motivația, scopul și obiectivele studiului	77
4.1. Motivația studiului	77
4.2. Scopul și obiectivele studiului	77
5. Material și metodă	79
5.1. Selecția cazurilor și metodele de lucru	79
5.1.1. Selecția cazurilor	79
5.1.2 Metode de lucru	80
5.2. Tehnici de lucru histopatologice	81
5.3. Tehnici de lucru imunohistochimice	83
5.4. Tehnici de lucru genetice	87
5.5. Analiza statistică	88
6. Studiul 1 – Factorii de prognostic clinico-imagistici și morfogenetici în gliomele de grad scăzut	91
6.1. Introducere	91
6.2. Obiective	93
6.3. Material și metodă	94
6.4. Rezultate	97

6.4.1. Aspecte clinice	97
6.4.2. Aspecte imagistice	102
6.4.3. Aspecte morfogenetice.....	109
6.4.4. Cazuri particulare de glioame de grad scăzut.....	121
6.5. Discuții	139
6.6. Concluzii.....	148
7. Studiul 2 – Factori implicați în agresivitatea glioamelor de grad 4	149
7.1. Introducere	149
7.2. Obiective.....	151
7.3. Material și metodă.....	152
7.4. Rezultate	155
7.4.1. Caracteristici clinico-demografice.....	155
7.4.2. Caracteristici imagistice	173
7.4.2 Caracteristici histogenetice	186
7.4.4. Cazuri particulare de glioame de grad 4	207
7.5. Discuții	231
7.6. Concluzii.....	239
8. Concluzii	241
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	245
REFERINȚE	246

Cuvinte cheie – Astrocitom, factori de risc, gena CDKN2A, Glioblastom, gliom, IDH, Nestin, prognostic.

Teza de doctorat cuprinde:

- 274 de pagini, dintre care 55 de pagini Partea Generală
- 223 de figuri, dintre care 5 în Partea Generală
- 37 tabele, dintre care 2 în Partea Generală
- 304 de referințe bibliografice

Notă: în prezentul rezumat cuprinsul a fost păstrat sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

INTRODUCERE

Prezenta lucrare are ca scop o descriere a patologiei tumorale primare a sistemului nervos central (glioame de grade diferite) urmărind caracteristicile clinice, imagistice, histopatologice, imunohistochimice și citogenetice ale acestora. Aceste date sunt imperios necesare, atât pentru buna înțelegere a mecanismelor de producere și evoluție a acestor entități, cât și pentru stabilirea unor criterii clare de diagnostic morfopatologic și identificarea unor factori de prognostic cu rol în supraviețuirea pacienților.

Prin consultarea literaturii de specialitate actuale, am observat o preocupare deosebită a mai multor cercetători asupra criteriilor de diagnostic precoce al glioamele, precum și importanța prognosticului în etapele evolutive ale lor. Astfel, tema aleasă reprezintă un subiect de actualitate, în care, până în prezent nu se cunosc foarte multe date.

Un gliom ce posedă caracteristici clinice și imagistice de benignitate poate avansa într-o perioadă foarte scurtă de timp, încât viața pacientului nu mai poate fi salvată. De asemenea, topografia leziunii tumorale poate crea condițiile necesare unui comportament agresiv, în pofida unor dimensiuni scăzute și/sau a unor aspecte de benignitate. Deopotrivă aspectelor clinico-imagistice iluzorii este și tabloul morfo-genetic implicat în procesul patogenetic. Modificările ce au loc în etapele de dezvoltare au rol determinant în rata proliferativă, evoluția lentă sau rapidă spre agresivitate, prognosticul pacientului, atitudinea terapeutică și implicit în supraviețuire. Aceste aspecte deluzorii, enunțate anterior, coroborate cu aspectul histopatologic, de cele mai multe ori similar, reprezintă motivația acestei teze.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Anatomia și histofiziologia sistemului nervos central

Sistemul nervos central se dezvoltă din neuroectoderm în urma unui proces de neurulație rezultând tubul neural. De la acest nivel, se vor forma cinci vezicule cerebrale ce vor contura telencefalul (emisferele cerebrale și nucleii bazali), diencefalul (talamus, hipotalamus, subthalamus, epitalamus), mezencefalul, metencefalul (cerebelul și puntea) și mielencefalul (bulbul rahidian).

Sistemul nervos central este alcătuit dintr-o rețea de celule nervoase și de celule de suport. Celulele nervoase sau neuronii se pot clasifica după neuriți sau funcție. Aceștia sunt compuși din somă, dendrite și axon.

Celulele de suport ale sistemului nervos central sunt neurogliile centrale: astrocite, oligodendrocite, microglii și celule endimale.

Astrocitele sunt cele mai mari celule gliale, nu formează mielină și sunt de patru tipuri: protoplasmice, fibroase, interlaminare și astrocite cu proiecții varicoase. Au rol în nutriția neuronală, în înlăturarea neurotransmițătorilor din cursul sinapsei și homeostazia celulară.

Oligodendrocitele se localizează atât în substanța cenușie, cât și în substanța albă nevraxială. Oligodendrocitele interfasciculare se localizează printre axonii neuronilor și au rol în formarea tecii de mielină. Oligodendrocitele satelite se localizează la nivelul pericarionului, doar în substanța cenușie, cu rol în monitorizarea fluidului extracelular, iar la nevoie, pot migra în substanța albă devenind oligodendrocite interfasciculare.

Microgliile au rolul de a fagocita detritusuri celulare și structuri lezate ale sistemului nervos central.

Celulele endimale formează membrana limitantă internă a ventriculilor, câteodată membrana limitantă externă subpială și intră în componența plexului coroid, responsabil de secreția lichidului cefalorahidian.

2. Stadializare, aspecte imagistice, histopatologice și genetice ale gliomelor

Ultima ediție a cărții albastre a Organizației Mondiale a Sănătății din 2021 aduce schimbări majore în ceea ce privește clasificarea, gradarea și nomenclatura tumorilor. Pentru prima dată, clasificarea acestora ține cont de populația adultă și cea pediatrică. Unele tipuri de gliome au fost restrânse sau au devenit subtipuri, după constatarea unor modificări genetice comune. În schimb, au fost recunoscute șapte noi entități tumorale neoplazice. De asemenea, a fost păstrată încadrarea în grad a unor tipuri de gliome, pe când altele au fost ajustate.

Astfel, gliomele sunt divizate în funcție de diagnosticul histopatologic și biomolecular:

- Gliome difuze ale adultului
 - Astrocitomul IDH mutant;
 - Oligodendrogliomul IDH mutant și codeleție 1p/19q;
 - Glioblastomul IDH wild type.
- Gliome difuze de grad scăzut ale populației pediatrică
 - Astrocitomul difuz cu alterarea MYB sau MYBL1;

- Gliomul angiocentric;
- Tumora neuroepitelială polimorfă de grad scăzut a tinerilor;
- Gliomul difuz de grad scăzut cu alterarea căii MAPK.
- Gliome difuze de grad înalt ale populației pediatrice
 - Gliomul difuz de linie mediană cu alterarea H3 K27;
 - Gliomul difuz emisferic cu mutația H3 G34;
 - Gliomul difuz de grad înalt al populației pediatrice, IDH wild type și H3 wild type;
 - Gliomul emisferic al copilului.
- Gliome astrocitare circumscrise
 - Astrocitom pilocitic;
 - Astrocitom de grad înalt cu aspecte piloide;
 - Xantoastrocitomul pleomorf;
 - Astrocitomul subependimal cu celule gigante;
 - Gliomul cordoid;
 - Astroblastomul cu alterarea MN1.

3. Managementul gliomelor sistemului nervos central

Protocolul de diagnostic și management al pacientului cu tumoră glială a sistemului nervos central este unul complex, uneori anevoios, din cauza resurselor materiale, câteodată limitate. Acest protocol prevede:

- examen clinic,
- examen imagistic,
- management preoperator,
- excizie chirurgicală,
- examen histopatologic,
- teste moleculare,
- tratament,
- urmărire.

Tot acest protocol are nevoie de o simplificare a procedurilor cu păstrarea acurateții diagnosticului. Acest aspect poate fi îmbunătățit prin asocierea unor markeri biologici specifici

cu un examen imagistic, astfel încât tratamentul să înceapă prompt și corect asupra gradului histopatologic corespunzător.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. Motivația, scopul și obiectivele studiului

Diagnosticul corect al glioamelor sistemului nervos central presupune evaluarea tuturor etapelor evolutive, de la nivel clinic (simptomatologia), apoi aspect macroscopic (examinări imagistice) și până la nivel microscopic. Motivația constă în anumite particularități cu caracter înșelător pe care glioamele le posedă. Spre exemplu, o tumoră microvolumetrică cu caracteristici imagistice de beninătate se poate comporta precum una malignă în funcție de topografia sa. O tumoră, care din punct de vedere clinic și imagistic, are aspect benign, poate evolua într-un timp foarte scurt spre o tumoră malignă devenind, astfel foarte agresivă loco-regional. Un alt aspect, deloc de neglijat, rezidă din modificările genetice ale glioamelor, care influențează rata proliferativă, evoluția, prognosticul, precum și atitudinea terapeutică.

Studiul are ca scop realizarea unor criterii clare de diagnostic precoce, astfel încât prin utilizarea a cât mai puține mijloace de investigații paraclinice să se poată formula un diagnostic cert care să aducă un impact socio-economic pozitiv. Un alt element ce trebuie urmărit în managementul cazurilor de glioame este reprezentat de prognosticul acestora. Asocierile parametrilor de studiu mai au ca scop identificarea principalilor factori de prognostic implicați în agresivitatea și în mortalitatea crescută a acestor entități tumorale. Identificarea lor permite o evaluare corectă a supraviețuirii pacienților, orientarea către metoda terapeutică cea mai eficientă, precum și deschiderea unor perspective viitoare de cercetare în vederea îmbunătățirii speranței de viață.

5. Material și metodă

Acest studiu a fost realizat în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Județean de Urgență „Sf. Ap. Andrei” Constanța. Au fost analizate cazurile pacienților internați cu diagnosticul prezumptiv de tumoră a sistemului nervos central, din secția de Neurochirurgie, din cadrul aceluiași spital, în perioada 1 ianuarie 2011 – 31 decembrie 2020. În lot au fost incluși pacienți cu tumori primare, localizate și cu origine la nivelul sistemului nervos central. Au fost excluși din studiu pacienții cu date clinice indisponibile, cu foi de

observație cu date incomplete sau insuficiente, fără investigații imagistice relevante și cu teste imunohistochimice efectuate în alte unități sanitare. De asemenea, nu au fost incluse cazurile de recidivă tumorală și diagnosticate prin examen necroptic.

Pasul inițial, după selectarea cazurilor, a constat în studiul foii de observație a pacientului. Din aceasta au fost extrase informații ce au fost inserate în baza de date a studiului. Ulterior au fost căutate și identificate date despre aspectele imagistice ale gliomelor sistemului nervos central.

Piese de tumorectomie provenite din cadrul secției de neurochirurgie beneficiază de un proces de descriere macroscopică și de prelucrare pentru ca în final să rezulte lame colorate cu Hematoxină-Eozină pentru examinarea microscopică.

Testele imunohistochimice au fost efectuate pentru fiecare pacient din lotul de studiu pe un bloc reprezentativ al cazului. Au fost utilizați markerii: IDH1 R132H, Ki-67, Nestin, p53, PTEN și MGMT.

Testele citogenetice au fost efectuate prin tehnica hibridizării in situ prin fluorescență pe blocurile de parafină pe care s-au efectuat și testele imunohistochimice. Au fost utilizate sondele pentru determinarea genei CDKN2A și a codelei 1p/19q (acolo unde a fost cazul).

Datele clinico-imagistice și morfogenetice au fost introduse în baza de date Microsoft Excel 2010. Analiza statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programului SPSS versiunea 26. Parametrii de lucru au fost analizați cu ajutorul testelor corespunzătoare. Toate rezultate a căror valoare p a fost sub 0,05 au fost considerate semnificativ statistice.

6. Studiul 1 – Factorii de prognostic clinico-imagistici și morfogenetici în gliomul de grad scăzut

Tumori gliale primare ale sistemului nervos central de grad 1 și 2 sunt asimilate de Organizația Mondială a Sănătății drept gliom de grad scăzut. În acest grup se întâlnesc: astrocitomul pilocitic, astrocitomul pilomixoid, astrocitomul subependimal cu celule gigante, xantastrocitomul pleomorf, astrocitomul de grad 2 și oligodendrogliomul de grad 2.

În cazul populației adulte, cel mai frecvent acestea sunt supratentoriale, cu o supraviețuire de aproximativ 30% la 10 ani de la diagnostic. Se caracterizează printr-un ritm lent de creștere și un index proliferativ scăzut. Această lentoare în dezvoltare face ca pacientul să performeze o perioadă considerabilă de timp, fără nicio simptomatologie.

Din cauza comportamentului evolutiv imprevizibil, două deziderate sunt esențiale în studiul acestor categorii de glioame: progresia spre o entitate malignă și identificarea unor factori de prognostic cu rol în supraviețuirea de lungă durată a pacienților.

Scopul acestui studiu este de a identifica cei mai importanți factori de prognostic pentru glioamele de grad scăzut, prin analiza asocierilor între aspectele clinico-imagistice și morfo-genetice, în vederea evaluării corecte și prompte a diagnosticului.

6.4. Rezultate

Vârsta medie la momentul diagnosticului a fost de 56,31 ani, cu o distribuție uniformă a cazurilor între decadele 5-7 de viață. Am observat o frecvență crescută a cazurilor în dreptul sexului feminin (62,50%). Acuzele clinice care au determinat prezentarea la medic au constat în principal în crize epileptice (68,75%), cefalee (50%) și deficite motorii de tip parezelor și plegiilor (37,50%). Un predictor al mortalității identificat a fost prezența crizelor epileptice. Pacienții care au dezvoltat crize epileptice au avut o supraviețuire medie mult mai scăzută (27 de săptămâni), față de cei care nu au prezentat crize epileptice (156,75 săptămâni) ($p=0,048$). Debutul simptomatologiei a fost în cele mai multe cazuri precoce, pacienții prezentându-se la medic în prima lună de la debutul acestora. Tratamentul radio-chimioterapeutic a urmat celui chirurgical la 87,5% dintre pacienți. Pacienții care au beneficiat de tratament au avut o medie mai mare de supraviețuire ($p=0,008$).

93,75% din cazuri au fost localizate supratentorial, un singur caz a fost identificat la nivelul cerebelului. S-a observat o tendință crescută a cazurilor la nivel frontal, fronto-temporal și parieto-occipital. Măsurătorile au remarcat o medie a diametrelor maxime ale leziunilor investigate de 43 mm. Am constatat o asocieră a diametrului maximal și supraviețuirea pacienților. Astfel, în cazul leziunilor de mari dimensiuni am observat o supraviețuire mai lungă, decât în cazurile cu diametre maxime scăzute ($p=0,024$).

Glioamele au produs un edem peritumoral cuantificabil imagistic în 93,75% din cazuri. Deplasarea linei mediane s-a produs cu o medie de 7,5 mm. Efectele produse prin deplasarea sa reprezintă un factor de risc asociat mortalității ($HR=1,150$, $p=0,025$). Examenele imagistice efectuate după intervenția chirurgicală au surprins o rezecție completă a tumorilor în 43,75% din cazuri. Media volumului rezidual a fost de $7,82 \text{ cm}^3$. De asemenea, un volum rezidual crescut s-a corelat cu o rată scăzută de supraviețuire ($p=0,049$). După rezecția completă a formațiunii tumorale și implicit a absenței reziduului tumoral s-a observat o medie de supraviețuire crescută de 158 săptămâni, față de cazurile în care rezecția a fost incompletă sau

parțială (97,75 săptămâni) ($p=0,033$). Prezența reziduului tumoral reprezintă un factor de risc negativ independent în supraviețuirea pacienților ($HR=5,476$, $p=0,043$).

Studiul imunomarkerului IDH1 a identificat o pozitivitate a acestuia în 81,25% din cazuri. Două entități cu aspecte histopatologice de oligodendrogliom s-au confirmat prin pozitivarea reacției IDH1 precum și prin prezența codeleției 1p/19q. Indexul proliferativ a avut o medie de 2,81%. Am observat o diferență semnificativă statistic între indexul proliferativ și unul dintre simptomele frecvente. Un Ki67 scăzut s-a corelat cu prezența cefaleei ($p=0,014$). Gradul de maturitate celulară evaluat prin markerul Nestin a fost pozitiv în 62,50% din cazuri, cele mai multe cazuri (31,25%) având o intensitate puternică. O reacție nucleară de peste 10% la markerul imunohistochimic p53, a fost observată în 75% din cazurile studiate. Am constatat o asociere semnificativă statistic între pozitivitatea lui p53 și gradul de deplasare al liniei mediane ($p=0,004$). De asemenea, pozitivitatea sa s-a corelat cu o rată de supraviețuire scăzută ($p=0,044$). În cazul expresiei imunohistochimice a statusului metilării (MGMT) am observat că în 81,25% din cazuri acesta a fost negativ sau pozitiv în sub 10% din nucleii. Astfel, în cazul unui procent mai mare de nucleii pozitivi s-au remarcat diametre tumorale mai mari, precum și o deplasare mai accentuată a liniei mediane ($p=0,036$, respectiv $p=0,040$). În cazul markerului PTEN am observat un procent crescut al imunointensității slab pozitive (37,50%). Analiza genei CDKN2A prin FISH a relevat alterări de tipul delețiilor și amplificărilor însumând 31,25% din cazuri, doar la nivelul gliomelor de grad 2. Delețiile și amplificările genei s-au asociat cu un indice proliferativ crescut ($p=0,043$, respectiv $p=0,046$). Pacienții care au avut un status normal al genei CDKN2A au avut o rată de supraviețuire crescută ($p=0,009$). Astfel, pacienții care au prezentat un status normal, au avut o medie de supraviețuire de 143 de săptămâni, cei cu deleții 137 de săptămâni, iar cei cu amplificări 2,5 săptămâni ($p=0,027$). Prin urmare, alterările genei CDKN2A reprezintă un factor de risc independent pentru mortalitate ($HR=13,647$, $p=0,001$), cel mai important element fiind reprezentat de delețiile sale, fie homozigote, fie heterozigote ($HR=9,413$, $p=0,016$).

6.5. Discuții

Gliomelor de grad scăzut, în special cele cu origine astrocitară, se găsesc frecvent în populația pediatrică. În cazul populației adulte, frecvența acestora este mai crescută în decadele 4-5 de viață. În lotul de pacienți prezentat, pacienții au avut o vârstă mai înaintată, frecvența crescută a gliomelor fiind în decadele 5-7 de viață.

Țara noastră a raportat la nivel european o rată anuală medie de 10 gliome. Prezentul studiu a identificat în regiunea de sud-est a României o medie de 2,67 gliome de grad scăzut pe an. Cea mai mare predominanță a acestora se înregistrează în dreptul sexului masculin, peste 55% din cazuri, contrar analizei din prezentul studiu. Studii de secvențiere a ARN-ului au identificat diferențe în evoluția și patogeneza gliomelor de grad scăzut în funcție de sexul pacientului. Unele aspecte genetice și hormonale pot avea un rol protectiv pentru unul din sexe, pentru celălalt putând avea un caracter indiferent sau de evoluție negativă.

Tabloul clinic este unul nesugestiv, cele mai întâlnite semne și simptome sunt reprezentate de crize convulsive, cefalee și deficite motorii, mai rar apar deficite cognitive, confuzie sau oboseală. În peste 70% din cazuri, semnul evocator și de debut este reprezentat de epilepsie. De regulă, aceasta apare în cazul localizării procesului tumoral la nivel frontal. Această distribuție a fost întâlnită și în cadrul acestui studiu. Prezența epilepsiei a fost demonstrată de unii cercetători ca fiind un factor de prognostic pozitiv. Însă, această manifestare trebuie să fie solitară, neasociată cu deficite motorii și/sau cognitive.

Aspectele topografice ale gliomelor sunt neconcludente. Cele mai multe cazuri sunt supratentoriale, putând fi dispuse în orice emisferă și având cel mai adesea sediul la nivelul lobului frontal. Unele studii au arătat că dimensiunea maximă a tumorii poate reprezenta fie un factor de prognostic, fie un element ce poate indica riscul de malignizare. Însă, nu exista o limită minimă exactă în ceea ce privește dimensiunea. Deplasarea liniei mediane a fost neglijată până de curând, când mai mulți cercetători au identificat anumite particularități cu implicații genetice, care se răsfrâng asupra prognosticului și a evoluției tumorale. De asemenea, unii cercetători au asociat deplasarea liniei mediane cu un risc crescut pentru transformare malignă.

Studii anterioare nu au identificat mari diferențe între o rezecție completă și una subtotală. Anumiți autori au propus ca ablația chirurgicală să fie una extinsă. Însă, câteva studii au asociat această tehnică pentru gliomele de grad scăzut cu status IDH wild type. Pentru a elimina orice controverse, dar și pentru a furniza cea mai bună cale de a îmbunătăți supraviețuirea, consensul actual stabilește excizia macroscopică completă ca standardul de aur al tratamentului chirurgical. Prezentul studiu susține acest aspect, statusul genei IDH nu influențează supraviețuirea, în schimb ablația completă are rol prognostic pozitiv în ceea ce privește supraviețuirea pacienților.

În prezentul studiu am evidențiat importanța genei CDKN2A, observând urmările alterărilor acesteia cu privire la supraviețuirea pacienților. Reis GF et al. a evidențiat asocierea mutațiilor genei CDKN2A cu mutațiile genei IDH care imprimă o creștere a agresivității gliomelor de origine astrocitară. În cazul gliomelor de origine oligodendrogială, Bortolotto

S et al. a demonstrat că mutațiile genei CDKN2A s-au asociat cu fenomene de anaplasie celulară și implicit cu o creștere a mortalității. Subiectul gradării histopatologice după indexul proliferativ a fost foarte dezbătut, însă fără foarte multe succese înregistrate în acest scop.

Mukasa A et al. a identificat o strânsă asociere între p53 și mutațiile IDH, susținută de Reis GF et al. care denotă acestei asocieri un puternic impact negativ asupra supraviețuirii, indiferent de statusul genei CDKN2A. Prezentul studiu vine ca o completare asupra celorlalte două, indicând faptul că supraexprimarea identificată în gliomele de grad 2 se asociază cu o rată scăzută de supraviețuire, dar cu toate acestea nu reprezintă un factor independent de risc asupra mortalității. Rolul său cu privire la scăderea speranței de viață este cauzat în special de asocierea cu amplitudinea devierii liniei mediane.

Nestin este utilizat în diferențierea celulară, reprezentând un marker al acestor procese. În cazul unei imunopozitivități puternice, se asociază cu un prognostic nefast și se corelează negativ cu mutațiile genei IDH. În prezentul studiu am observat un aspect paradoxal reprezentat de faptul că imunointensitățile puternice s-au asociat cu o supraviețuire mai mare a pacienților. Acest fenomen se poate explica prin coroborarea datelor rezultate în urma asocierii mutațiilor CDKN2A și Ki-67.

MGMT este o enzimă ce are rolul de a repara injuriile lanțului ADN, precum și un predictor al răspunsului la chimioterapie. Asemenea, studiului lui Butta S. et al., am observat o supraviețuire crescută a pacienților ce au prezentat o imunoexpresie scăzută sau absentă. Un marker implicat în procesul de agresivitatea tumorală este PTEN. Coexistența asocierii fie dintre alterările genei CDKN2A și p53, fie dintre alterările genei CDKN2A și PTEN, indică un caracter agresiv gliomelor de grad scăzut, putând fi considerate procese premergătoare avansării spre un grad histopatologic înalt. Acest studiu confirmă corelația asocierii dintre gena CDKN2A și expresia imunohistochimică a mutației genei PTEN, indicând un comportament agresiv și o supraviețuire mai scăzută a pacienților diagnosticați cu astfel de mutații genice.

6.6. Concluzii

Am identificat următorii parametri care denotă agresivitatea tumorală responsabilă de generarea unor factori de risc negativi, reprezentând cauze directe asupra decesului: deplasarea liniei mediane, prezența rezidului tumoral, mutațiile genei CDKN2A, asocierea dintre deplasarea liniei mediane și deleția CDKN2A, asocierea dintre prezența restului tumoral și deleția CDKN2A.

7. Studiul 2 – Factori implicați în agresivitatea gliomelor de grad 4

Glioamele de grad 4 au fost denumite până în 2021 glioblastoame. Ultima clasificare OMS a tumorilor sistemului nervos central a împărțit aceste entități după statusul genei IDH. Aceste tumori au o incidență de 4,1 la 100000 de locuitori, mai frecvente în dreptul sexului masculin și în cazul vârstnicilor.

În privința glioblastomului IDH se cunosc doar trei factori de prognostic negativ care sunt reprezentați de vârsta pacienților peste 65 de ani, necroza tumorală extinsă și statusului metilării promoterului MGMT. În ceea ce privește astrocitomul de grad 4 IDH mutant se cunosc ca fiind factori de prognostic negativ vârsta înaintată a pacienților, delețiile homozigote ale genelor CDKN2A, CDKN2B și Rb1, rezecția incompletă cu prezența de rest tumoral.

Studiul își propune o analiză a parametrilor clinici, imagistici și morfogenetici într-un lot de pacienți diagnosticați cu gliom de grad 4, în vederea identificării principalilor factori de prognostic implicați în agresivitatea acestora. Deopotrivă, agresivitatea acestora a fost evaluată atât în două grupuri, stratificate după statusul genei IDH, pentru a evidenția cei mai elocvenți factori de risc pentru fiecare categorie, cât și în fiecare grup în parte pentru a evalua amplitudinea acestor factori.

Un alt obiectiv a constat în efectuarea unei analize a maturității celulare, responsabilă de consecințele fenomenelor hipoxice pentru identificarea principalelor asocieri cu privire la supraviețuirea pacienților.

7.4. Rezultate

Au fost identificate 85 de cazuri de glioame de grad 4 (46 de astrocitoame și 39 de glioblastoame). Vârsta medie a pacienților diagnosticați a fost de 59,05 ani (20-82 ani) cu o ușoară creștere a acesteia în cazurile de glioblastom IDH wild type. Vârsta a reprezentat un factor de risc independent în ceea ce privește mortalitatea în cadrul gliomelor de grad 4 (HR=1,042, p=0,001). Vârsta de peste 50 de ani a reprezentat un factor de risc independent în ceea ce privește mortalitatea în cazul glioblastomului IDH wild type (HR=3,127, p=0,034).

Am observat o predominanță a gliomelor asupra sexului masculin. Cele mai frecvente motive de prezentare la medic au fost: tulburări cognitive, cefalee, deficite motorii și semne de hipertensiune intracraniană. Cele mai întâlnite comorbidități ale pacienților au fost reprezentate de hipertensiune arterială (32,94%), diabet zaharat (27,06%) și alte patologii

tumorale (8,24%). În cazul astrocitoamelor am identificat ca factori de risc negativi prezența hipertensiunii arteriale (HR=2,460, p=0,019) și a diabetului zaharat (HR=2,369, p=0,018).

Majoritatea entităților tumorale au fost localizate supratentorial (95,29%), identificându-se și patru leziuni la nivelul cerebelului. Cele mai multe gliome s-au localizat la nivelul lobului temporal (22,35%). Volumul mediu tumoral a fost de 88,05 cm³, ușor mai crescut în dreptul glioblastoamelor (91,69 cm³).

Structurile liniei mediane au fost deplasate în medie cu 8,52 mm. Examinările imagistice postchirurgicale au observat o ablație completă a tumorilor în 23,53% din cazuri, ușor mai crescută în cazurile de astrocitom IDH mutant (23,91%). Tipul intervenției chirurgicale reprezintă un factor de risc independent în supraviețuirea pacienților în special al celor diagnosticați cu astrocitom (HR=2,501, p=0,023).

Media necrozei tumorale a fost de 33,53%, ușor mai crescută în cazul astrocitoamelor. Prezența unui procent mediu crescut de necroză în astrocitoame reprezintă un factor de risc negativ în supraviețuirea pacienților (HR=1,054, p<0,001). Indicele proliferativ a avut o rată medie de 44,45%, cu o diferență semnificativă statistic între astrocitoame și glioblastoame, în sensul că astrocitoamele au avut o rată proliferativă crescută (p=0,030). În analiza univariată, imunointensitățile moderate și puternice ale Nestinului au reprezentat un factor de risc independent cu privire la mortalitatea pacienților diagnosticați cu glioblastom (HR=2,919, p=0,043, respectiv HR=4,028, p=0,003).

Densitatea microvasculară medie a fost de 45,68 pe 1 mm², mai mare în cazul astrocitoamelor IDH mutant (50,17/mm²). În cazul acestora, densitatea microvasculară reprezintă un factor de risc independent în ceea ce privește mortalitatea (HR=1,092, p<0,001), amplitudinea crescând la 5,023 (p<0,001) în creșterea mediei de peste 50/mm².

În cazurile de glioblastom, expresia crescută a MGMT a reprezentat un factor de risc independent al mortalității (HR=4,821, p<0,001). În ambele entități tumorale supraexpresia p53 s-a însoțit de o supraviețuire scăzută (p<0,001). Acest aspect reprezintă un factor de risc independent predictor al cu impacte diferite în astrocitoame (HR=7,033, p=0,002) și în glioblastoame (HR=3,421, p=0,001).

În cazul glioblastoamelor, imunoreactivitatea scăzută și reacția negativă a markerului PTEN reprezintă un factor de risc independent cu privire la supraviețuirea pacienților (HR=3,782, p=0,043).

Atât delețiile, cât și amplificările genei CDKN2A reprezintă factori de risc independenți cu privire la mortalitatea pacienților (HR=1,797, p=0,016, respectiv HR=3,864, p=0,003).

7.5. Discuții

Astrocitomul IDH mutant și glioblastomul IDH wild type reprezintă aproximativ jumătate din tumorile maligne ale sistemului nervos central. Incidența acestora se află în ușoară creștere din cauza îmbătrânirii populației și a diverșilor factori de mediu, mecanisme care nu sunt deocamdată elucidate.

Tabloul clinic este nespecific și este condiționat de alți factori. Cea mai frecventă manifestare care determină venirea la medic este tulburarea cognitivă. În pofida prezenței sale la un număr crescut de pacienți, aceasta nu influențează supraviețuirea, aspect remarcat și în acest studiu. Pe lângă alți parametri, Pierscianek D et al. a identificat hipertensiunea arterială ca factor de risc. Se speculează ideea efectelor medicamentelor antihipertensive de a produce metaboliți potențiatori ai proceselor de tumorigeneză. Un alt parametru implicat în mod direct și independent în supraviețuirea scăzută a pacienților identificat este reprezentat de prezența diabetului zaharat. În analiza condusă de Montemurro N et al. s-a constatat faptul că statusul hiperglicemic persistent afectează atât supraviețuirea totală, cât și supraviețuirea fără progresie tumorală în peste 80% din cazurile studiate.

Spre deosebire de gliomele de grad scăzut, dimensiunile și volumul tumoral nu reprezintă factori de prognostic. Acest aspect se datorează faptului că gliome de aceleași dimensiuni sau volume au un impact diferit în ceea ce privește supraviețuirea pacienților, cauzat în special de aspectul histopatologic și genetic.

Un parametru important este volumul tumoral rezidual, acesta fiind implicat în mod direct în supraviețuirea scăzută a pacienților. Sunt studii care au observat o rată de supraviețuire crescută chiar și în condițiile unui volum tumoral de sub 2 cm³ sau 5 cm³, adică o rată de rezecabilitate de 95% sau 75%.

Ultimele clasificări ale tumorilor sistemului nervos central au pus accentul pe gena izocitrat dehidrogenazei. Diverse studii au arătat că mutațiile sale au un rol prognostic favorabil asociat cu o supraviețuire crescută în cazul populației adulte. Utilitatea lui Ki-67 constă în diferențierea gliomelor de grad înalt de cele de grad scăzut sau între astrocitomul pilocitic și fenomenele de glioză. Potețialul proliferativ crescut din gliomele de grad 4 are la baza patogenezei o populație de celule imature. Aceste fenomene de imaturitate și de replicativitate derivă din procesul de hipoxie celulară. Hipoxia, în aceste cazuri, este automenținută prin procese de neovascularizație. Supraexprimarea Nestin se asociază cu gradul histopatologic, invazivitatea și maturitatea celulară. Utilitatea acestui marker s-a observat și în cadrul proceselor de angieneză tumorală. Nestinul este exprimat în celulele endoteliale ale

capilarelor embrionului, precum și în celulele endoteliale progenitoare, dar nu se identifică în celulele endoteliale mature. În gliomele de grad 4, indiferent de metoda de cuantificare, densitatea microvasculară este una crescută, aspect prezentat și în acest studiu.

O altă consecință a hipoxiei este necroza tumorală cu aspect caracteristic de pseudopalisadă. O ipoteză bazată pe studii observaționale, a remarcat că în adiacența zonelor de necroză se identifică cea mai mare rată de proliferare precum și cea mai mare densitate de celule stem pluripotente. Prin urmare, această relație între imaturitate celulară, densitate microvasculară și indicele proliferativ este automenținută în cadrul gliomelor de grad 4, aspect remarcat și în prezentul studiu, prin asocierile între acești parametri studiați.

În cazul gliomelor de grad 4, supraexprimarea p53 este mai des întâlnită în asocieri cu mutațiile IDH, aspect evidențiat și în prezentul studiu. Alterările la nivelul genei o pot inactiva sau pot crea proteine mutante, care se vor implica în procese de angiogeneză, de necroză tumorală cauzată de glicoliză aerobă și de reparare al ADN-ului. MGMT este o genă supresoare implicată în repararea defectelor mutagene produse în timpul replicării și transcripției. Asemenea, studiilor realizate de Younis SG et al. și Pandith AA et al. expresia proteinei MGMT reprezintă un factor de prognostic independent în supraviețuirea pacienților.

Gena CDKN2A are rol în modularea activității a două proteine oncosupresoare p53 prin intermediul proteinei p14ARF și Rb prin intermediul proteinei p16INK4a. Mutațiile și amplificările genei prezintă un factor de risc independent predictor al mortalității în acest grup de gliome. Un mecanism uzual întâlnit în procesul cancerigen este reprezentat de activitatea genei PTEN. Mutațiile la acest nivel reprezintă un eveniment tardiv în procesul gliomagenetic, acest lucru fiind explicat prin asocierea invers proporțională cu gradul histopatologic în evoluția astrocitoamelor.

7.6. Concluzii

În urma evaluării amplitudinilor factorilor de risc, am remarcat o creștere a acestora în funcție de entitatea tumorală glială. Astfel, pentru astrocitomul IDH mutant se remarcă o amplificare a efectelor factorilor de risc după cum urmează: prezența hipertensiunii arteriale și a diabetului zaharat, ablația subtotală, un procent crescut de necroză tumorală, o densitate microvasculară crescută, supraexprimarea p53 și mutațiile genei CDKN2A.

În cazurile de glioblastom IDH wild type se remarcă o amplificare a efectelor factorilor de risc după cum urmează: vârsta de peste 50 de ani, imaturitatea celulară cuantificată prin Nestin, supraexprimarea p53, imunoreactivitate scăzută sau absentă a PTEN.

9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Elementele de originalitate ale tezei sunt constituite din: perspectiva multidisciplinară a patologiei tumorale a sistemului nervos central, includerea în studiu a mai multor tipuri histopatologice și evaluarea acestora pe grade histopatologice, dar și individual prin utilizarea de diverși parametri, propunerea în protocolul standard de evaluare a pacienților cu gliom a unor elemente imagistice și markeri imunohistochimici, cu rol în prognosticul și supraviețuirea acestora. La nivel național nu s-a abordat o cercetare asemănătoare, iar pe plan internațional, rezultatele studiilor elaborate în prezenta lucrare au venit ca o completare asupra cercetărilor efectuate până în prezent, fiind recunoscute ca originale și de actualitate.

Rezultatele detaliate ale prezentului studiu au o adresabilitate mare, fiind utile rezidenților, cercetătorilor, dar și medicilor anatomo-patologi, geneticieni, neurologi, oncologi și neurochirurghi, subliniind importanța cooperării interdisciplinare și caracterului multidisciplinar al subiectului abordat.

Perspectivile viitoare pe care le deschide această teză de doctorat sunt reprezentate de abordarea parametrilor studiați pe o populație pediatrică cu patologie tumorală glială, evaluarea cazurilor de recidivă într-o manieră similară, precum și efectuarea de studii cu privire la răspunsul terapeutic al pacienților în funcție de particularitățile identificate.