



UNIVERSITATEA „OVIDIUS” DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

ANUL UNIVERSITAR 2022-2023

TEZĂ DE DOCTORAT

Corelații clinico-morfologice în diagnosticul tumorilor musculare netede ale corpului uterin

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat : **Prof. univ. dr. Mariana Așchie**

Doctorand : **Raluca Ioana Vodă**

Cuprins

ABREVIERI	12
INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	20
1. Anatomia, histologia și fiziologia uterului	22
1.1 Anatomia uterului	22
1.2 Histologia și fiziologia uterului	26
2. Aspecte epidemiologice și histopatologice ale tumorilor musculare netede ale corpului uterin	31
2.1 Clasificare și stadializare	31
2.2 Epidemiologie	33
2.3 Patogenie și modificări genetice	36
2.4 Caracteristici histopatologice și imunohistochimice	41
3. Microclimatul tumoral	46
3.1 Infiltratul inflamator limfocitar	46
3.2 Microvascularizația tumorală	52
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	57
4. Motivația, scopul și obiectivele studiului	59
4.1 Motivația studiului	59
4.2 Scopul și obiectivele studiului	59
5. Metodologie generală	61
5.1 Selecția cazurilor	61
5.2 Metode de lucru	62
5.2.1 Tehnici de lucru histopatologice	62
5.2.2 Tehnici de lucru imunohistochimice	64
5.2.3 Tehnica de lucru genetică	69
5.2.4 Analiza statistică	70
6. Aspecte clinico-morfologice ale tumorilor miocitare uterine benigne	72
6.1 Introducere	72
6.2 Obiective	74
6.3 Material și metodă	75
6.4 Rezultate	77
6.4.1 Analiza statistică	77
6.4.2 Forme particulare de leiomiom	101
6.5 Discuții	110
6.6 Concluzii	118
7. Rolul patogenezei asociat microclimatului tumoral în diagnosticul diferențial al tumorilor miocitare uterine	120
7.1 Introducere	120
7.2 Obiective	121
7.3 Material și metodă	122
7.4 Rezultate	124
7.4.1 Analiza statistică	124

7.4.2 Forme particulare	137
7.5 Discuții	148
7.6 Concluzii	155
8. Studiul retrospectiv al leiomiosarcoamelor și tumorilor musculare netede cu potențial malign incert	157
8.1 Introducere	157
8.2 Obiective	159
8.3 Material și metodă	160
8.4 Rezultate	163
8.4.1 Analiza statistică	163
8.4.2 Cazuri particulare	172
8.5 Discuții	185
8.6 Concluzii	190
9. Concluzii	192
10. Originalitatea tezei	196
BIBLIOGRAFIE	197

Cuvinte cheie – FISH, PD-L1, PTEN, supraviețuire, uter.

Teza de doctorat cuprinde:

- 219 de pagini, dintre care 35 de pagini Partea Generală
- 105 de figuri
- 36 tabele, dintre care 5 în Partea Generală
- 290 de referințe bibliografice

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

INTRODUCERE

Lucrarea de față are ca scop descrierea tumorilor primare cu punct de plecare țesutul muscular neted al corpului uterin, urmărind caracteristicile clinice, histopatologice, imunohistochimice și genetice ale acestora. Pentru o mai bună înțelegere a căilor de apariție și dezvoltare a acestor neoplazii, dar și pentru identificarea unor factori de prognostic ai evoluției pacientului, aceste date sunt esențiale.

În urma studierii literaturii de specialitate am constatat că cele mai recente cercetări în domeniu pun accentul pe evaluarea microclimatului tumoral ce cuprinde infiltratul inflamator limfocitar și microvascularizația tumorală, dar și felul în care acestea sunt implicate în patogeneza și influențează supraviețuirea pacientelor. Tema de cercetare aleasă este una de actualitate, în plin proces de dezvoltare și completare a cunoștințelor din prezent.

Rezultatele studiilor efectuate au fost comparate cu datele existente în literatura de specialitate, evidențiind similarități ce susțin ideile de cercetare, dar și aspecte particulare ce vin drept completare a informațiilor deja cunoscute. De asemenea, din fiecare studiu cuprins în teză s-au publicat în reviste de specialitate, recunoscute internațional, fie rezultatele obținute în urma analizei statistice, fie cazuri particulare, rare, validând astfel originalitatea tezei. La finele fiecărui studiu se găsește un capitol de concluzii, ce rezumă principalele aspecte evidențiate, contribuind la îndeplinirea obiectivelor acestei cercetări.

Rezultatele studiilor efectuate au fost comparate cu datele existente în literatura de specialitate, evidențiind similarități ce susțin ideile de cercetare, dar și aspecte particulare ce vin drept completare a informațiilor deja cunoscute. De asemenea, din fiecare studiu cuprins în teză s-au publicat în reviste de specialitate, recunoscute internațional, fie rezultatele obținute în urma analizei statistice, fie cazuri particulare, rare, validând astfel originalitatea tezei. La finele fiecărui studiu se găsește un capitol de concluzii, ce rezumă principalele aspecte evidențiate, contribuind la îndeplinirea obiectivelor acestei cercetări.

1. Anatomia, histologia și fiziologia uterului

1.1 Anatomia uterului

Uterul este un organ în formă de pară cu numeroase roluri, precum menstruația, sarcina, travaliul și nașterea. Uterul este situat în pelvis, între vezica urinară și rect. Se situează posterior de vezica urinară și de spațiul utero-vezical și anterior de rect și de fundul de sac recto-uterin. Este un organ mobil, ceea ce înseamnă că poziția lui variază cu gradul de distensie al vezicii urinare și rectului. Din punct de vedere structural și funcțional, are 2 porțiuni: corpul uterin și

colul uterin. Între coprul uterin și col, se află istmul, o regiune îngustă cu lungimea aproximativă de 1 cm.

1.2 Histologia și fiziologia uterului

Peretele uterin este format din trei straturi: endometrul sau mucoasa uterină; miometrul reprezintă stratul muscular, este continuu cu tunică musculară a salpingelor; perimetrul, seroasa uterină sau peritoneul visceral ce acoperă uterul.

Endometrul are 2 zone concentrice: stratul bazal, adiacent miometrului, are o lamina propria mai intens celulară și conține porțiunile bazale, profunde ale glandelor endometriale; stratul funcțional, superficial, are o lamina propria mai spongioasă și include cea mai mare parte din glandele endometriale, cât și epiteliul de suprafață. Caracteristic, joncțiunea dintre stratul bazal și miometru este neregulată, fibre musculare netede și stromă endometrială intersectându-se și uniformizându-se.

Miometrul este tunică cu cea mai mare grosime a uterului, reprezentată de fibre musculare netede separate de țesut conjunctiv ce conține plexuri venoase și limfatice. Este format din trei straturi musculare indistincte. Cele extern și intern sunt orientate predominant paralel cu axul lung al uterului. Cel mijlociu conține numeroase vase sanguine mari și vase limfatice, având denumirea de strat vascular. Acesta are grosimea cea mai mare, iar fibrele musculare sunt dispuse circular sau spiralat.

Cervixul are o structură histologică diferită de cea a corpului uterin. Mucoasa endocervicală este tapetată de un epiteliu cilindric simplu situat pe o lamina propria groasă, cu numeroase glande cervicale mari, ramificate, secretoare de mucus. Mucoasa exocervicală este reprezentată de un epiteliu scuamos stratificat non-keratinizant ce se continuă cu epiteliul vaginal. Joncțiunea dintre epiteliul scuamos și cel cilindric muco-secretor reprezintă zona de tranziție.

Ciclul menstrual necesită coordonarea controlului hipotalamic asupra funcției pituitare, modificările foliculare și luteale ovariene, feedback-ul pozitiv și negativ al hormonilor ovarieni către axul hipotalamo-hipofizar.

Faza menstruală reprezintă faza de sângerare, cu o durată aproximativă de 5 zile. Mecanismul sângerării menstruale este inițiat de scăderea secreției hormonilor steroizi. Are loc liza țesutului endometrial, iar $\text{PGF2}\alpha$ determină vasospasm, cu apariție leziunilor ischemice endometriale. Rezultatul este reprezentat de necroză focală, facilitată de către leziunile proteolitice. Focarele de necroză se unesc și determină eliminarea endometrului.

Faza foliculară are o durată de 10-16 zile. Celulele stratului bazal proliferază și formează un nou strat funcțional. Pe măsură ce crește grosimea endometrului, glande endometriale mici, drepte, încep să apară, iar arteriolele devin mai lungi și tortuoase pe măsură ce penetrează stratul funcțional. Grosimea endometrului se dublează în această fază.

Etapa ovulatorie durează 24-48 de ore, iar cea luteală 14 zile, timp în care are loc secreția de progesteron, iar endometrul secretă numeroase proteine pentru eventuala nidare a embrionului. Se caracterizează prin acțiunea estrogenilor și a progesteronului asupra glandelor endometriale care devin mai lungi și mai tortuoase, dezvoltarea vascularizației stratului superficial, glandele endometriale începând să secrete glicogen.

2. Aspecte epidemiologice și histopatologice ale tumorilor musculare netede ale corpului uterin

2.1 Clasificare și stadializare

Principală modificare a noii ediții a clasificării tumorilor uterine este trecerea de la o organizare în funcție de localizare și eventual în funcție de celula de origine la o clasificare ierarhică bazată pe asemănările dintre tumori. În acest fel, tumorile sunt împărțite conform localizării, categoriei, familiei, tipului și subtipului.

Conform WHO 2020, tumorile musculare netede se clasifică astfel:

- Leiomiom tipic
- Leiomiomatoză intravenoasă
- Tumoră musculară netedă cu potențial malign incert
- Leiomiom metastazant
- Leiomiosarcom

2.2 Epidemiologie

Leiomiomatoamele reprezintă tumori benigne alcătuite din fibre musculare netede și cantități variabile de țesut conjunctiv fibros, având drept termeni sinonimi: fibromiom, fibroid sau miom.

Se consideră că peste 70% din femei dezvoltă un astfel de neoplasm până la debutul menopauzei. Se estimează că 25% din pacientele la vârsta reproductivă prezintă manifestări clinice și că la 25% simptomele sunt suficient de severe pentru a necesita tratament. Incidența

estimată la vârsta reproductivă variază între 5,4% și 77%, în funcție de studiul populației sau de metoda diagnostică. Același lucru poate fi spus și despre prevalență, fiind raportată între 4,5% și 68,6%. Alte studii raportează o prevalență cuprinsă între 5% și 21%. Factorii de risc atribuiți leiomiomelor, atât modificabili, cât și nemodificabili, sunt reprezentați de: vârstă, rasă, obezitate, stil de viață etc.

Tumorile musculare netede cu potențial malign incert reprezintă un grup heterogen de neoplasme rare, atât din punct de vedere clinic, cât și histologic. Incidența acestor tumori nu este foarte bine documentată, variind în jurul valorii de 0,01% în cazul pacientelor tratate chirurgical pentru diagnosticul prezumptiv de leiomiom uterin. Ratele de recurență locală sau loco-regională variază între 7% și 27%. Aceste tumori pot reapărea târziu în evoluția pacientelor, după o perioadă medie de 51 de luni.

Leiomiosarcoamele uterine contribuie la aproximativ 70% din aceste tumori. Studiile din literatura de specialitate raportează rate de incidență variabile, de la 0,35/100000 până la 0,8/100000. Supraviețuirea la 5 ani este cuprinsă între 25% și 76%, iar în cazul bolii metastatice ca diagnostic inițial este de 10-15%. Alte studii au raportat rate de recurență locală de 70% chiar și în stadii incipiente. De asemenea, ratele de recurență variază între 45% și 75%, cele mai frecvente locuri de metastazare fiind la nivel pulmonar. Durata medie de timp până la apariția primei recurențe este de 12-24 luni.

2.3 Patogenie și modificări genetice

Factorii genetici au un rol semnificativ în dezvoltarea mioamelor. Apariția leiomiomelor multiple la aceeași pacientă înseamnă faptul că moștenirea genetică este implicată în dezvoltarea acestor tumori, astfel încât unele femei sunt mai predispuse pentru această patologie. Sunt patru mutații principale implicate în inițierea leiomiomelor: MED12, HMGA2, FH, COL4A5/COL4A6.

Zhang et al. au studiat mutațiile genetice a 167 cazuri de tumori musculare netede uterine, din care 18 au fost reprezentate de STUMP. Aceștia au observat că mutațiile p53 și delețiile PTEN au fost semnificativ mai frecvente în STUMP, leiomiosarcom și leiomiomul atipic decât în alte subcategorii tumorale, spre deosebire de mutațiile MED12 ce au fost mai frecvente în leiomiomele convenționale și leiomiomul mitotic activ.

Majoritatea leiomiosarcoamelor sunt aneuploide, cu anomalii complexe structurale și numerice. Mutații ale regiunilor 1p, 10q, 13q și 14q au fost observate în numeroase cazuri. Până

acum, doar câteva gene au fost asociate cu acest tip tumoral, incluzând TP53, RB1, MDM2, CDKN2A și KIT.

2.4 Caracteristici histopatologice și imunohistochimice

Din punct de vedere macroscopic, leiomioamele sunt de regulă multiple. Aceste tumori sunt bine delimitate, neîncapsulate, cu diametrul variabil. Pe secțiune, aspectul acestora este unul ferm, albicios, ”în vârtejuri”. Microscopic, majoritatea au margini bine delimitate și sunt alcătuite din celule fusiforme dispuse în fascicule ce se intersectează. Celulele tumorale au margini imprecise, citoplasma fibrilară, eozinofilă și nucleii sub formă de ”trabuc”, cu nucleoli mici și mitoze rare.

Aspectele macroscopice ale tumorii musculare netede cu potențial malign incert se suprapun de multe ori peste cele ale leiomioamelor tipice. Dimensiunea tumorilor din cazurile cu recurență este similară cu a celor ce nu reapar, dar unele neoplasme asociate cu recurența au prezentat ulterior margini neregulate. Trăsăturile microscopice ale acestei tumori sunt heterogene. Ținând cont de faptul că este o categorie diagnostică dificilă, s-au stabilit niște criterii diagnostice, dar care nu ar trebui respectate cu strictețe.

Leiomiosarcomul este o tumoră mezenchimală malignă cu originea la nivelul fibrelor musculare netede ce poate avea morfologie fusiformă, epitelioidă sau mixoidă.

Acestea sunt tipic leziuni nodulare unice, cu aspect cărnos, de consistență scăzută, cu diametrul mediu de 10 cm. Pe secțiune, se observă arii de hemoragie și necroză. Cele de tip mixoid pot fi gelatinoase și friabile. Tumorile fusiforme sunt celulare, formate din celule fusiforme cu citoplasmă eozinofilă, uneori în cantitate redusă, dispuse în fascicule dezorganizate, compacte, lungi ce se întretaie. Pleomorfismul nuclear este marcat, deși în unele tumori aspectele citologice sunt uniforme, înșelătoare. Se pot observa celule tumorale multinucleate și de tip osteoclastic. Numărul mitotic este mare, peste 4 mitoze/mm² și mitozele atipice sunt prezente. Necroza tumorală se caracterizează prin trecerea bruscă de la celule tumorale viabile la cele non-viabile. Pentru stabilirea diagnosticului, sunt necesare două din următoarele trei aspecte: necroză tumorală, atipii citologice marcate și peste 4 mitoze/mm².

3. Microclimatul tumoral

3.1 Infiltratul tumoral limfocitar

Un răspuns imun anti-tumoral eficient necesită prezența, activarea și co-stimularea tuturor componentelor limfoide ale sistemului imun, incluzând limfocite T CD8+, CD4+, limfocite B și celule limfoide înăscute. Nu doar prezența infiltratului tumoral limfocitar, dar și diferențierea și localizarea acestuia au rol în determinarea evoluției clinice. Infiltratul tumoral limfocitar este format în principal din celule T, celule B și celule NK. Activarea acestuia în diferite perioade, duce la fenotipuri heterogene.

Răspunsul imun antitumoral este cel mai probabil suprimat de celulele B reglatorii ce produc citokine imunoreglatorii, dar și inhibat direct prin limitarea celulelor inhibitorii efectoare, precum limfocitele T CD8+.

Prezența infiltratului limfocitar în tumori a fost asociată cu o evoluție clinică mai favorabilă. Distribuția sa este bine organizată în arii specifice. De exemplu, celulele B sunt observate în principal la nivelul marginilor invazive tumorale, pe când celulele NK sunt identificate mai ales în stroma.

Atât cantitatea, cât și calitatea infiltratului tumoral limfocitar sunt probabil factori ce influențează prognosticul și rezultatele terapeutice. Calitatea răspunsurilor celulelor T este determinată de recunoașterea antigenelor prin intermediul TCR.

Legarea receptorului PD-1, exprimat în principal pe suprafața celulelor T, la liganzii receptorilor, PD-L1 și PD-L2 exprimați de celulele tumorale, suprimă activarea celulelor T declanșată de interacțiunea MHC-TCR. Rezultatul este inducerea apoptozei celulelor T, cu inhibarea abilității lor de a ținti celulele canceroase. În numeroase tumori cu prognostic nefavorabil, se pot detecta nivele crescute ale expresiei PD-1/PD-L1.

În celulele leiomiosarcoamelor uterine, pierderea expresiei LMP2 inductibilă de interferonul γ s-a atribuit mutației domeniului de legare a ATP al JAK1, ducând la fosforilarea inadecvată a STAT1. Fosforilarea completă a STAT1 este necesară pentru activarea transcripțională a LMP2. Există studii care au demonstrat că pierderea semnalizării JAK1/STAT1 determină rezistență la blocada PD-1 și CTLA-4 prin incapacitatea de a stimula expresia HLA I. Aceste date sugerează că prezentarea antigenică defectuoasă în majoritatea leiomiosarcoamelor uterine poate fi un mecanism subiacent al rezistenței la inhibitorii blocadei ”checkpoint”.

3.2 Microvascularizația tumorală

Pentru a primi cantitatea necesară de oxigen și substanțe nutritive, astfel încât să poată supraviețui și prolifera, celulele tumorale trebuie să se afle la o anumită distanță de vasele sanguine. De aici rezultă necesitatea angiogenezei și recrutarea unei vascularizației proprii.

Spre deosebire de vascularizația normală, cea de tip tumoral este una heterogenă, tortuoasă, cu ramificări neregulate și dimensiuni mărite. Toate structurile ce intră în alcătuirea peretelui vascular sunt anormale: celulele endoteliale, pericitele, membrana bazală.

Tratamentul oncologic ținut asupra vascularizației tumorilor solide este utilizat în prezent, fiind în continuă dezvoltare. Neovascularizația este un eveniment cheie în dezvoltarea și metastazarea tumorilor maligne, având rol în aportul nutritiv și eliminarea produșilor finali ai metabolismului.

Neovascularizația tumorală poate afecta microclimatul tumoral prin favorizarea metastazării și inducerea imunosupresiei tumorale secundar inhibării maturării celulelor dendritice și prezentării de antigene, recrutarea de celule imunosupresive și inhibarea activității celulelor T citotoxice. Imaturitatea rețelei vasculare noi și absența adeziunii celulelor parietale determină hiper-permeabilizarea vaselor sanguine tumorale, cu o perfuzie slabă a țesutului neoplazic și hipoxie. Aceasta din urmă va accelera creșterea și metastazarea tumorilor solide. La rândul său, microclimatul tumoral va produce factori pro-angiogenici, rezultând astfel un cerc vicios.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. Motivația, scopul și obiectivele studiului

Diagnosticul corect al tumorilor musculare netede uterine implică evaluarea dintr-o perspectivă multidisciplinară, de la parametrii clinici, până la cei microscopici și genetici. Alegerea acestei teme derivă din manifestările clinice și aspectele imagistice nespecifice, caracteristicile histopatologice cu numeroase suprapuneri între diferitele categorii lezionale ale acestui spectru tumoral, dar și datele patogenice insuficiente în pofida numeroaselor studii efectuate până în prezent.

Prin studiul de față îmi propun analiza manifestărilor clinice, a caracteristicilor microscopice, rezultatelor imunohistochimice și genetice a variatelor categorii de tumori

musculare netede uterine, urmărind identificarea corelațiilor semnificative între parametrii evaluați, dar și identificarea rolului lor în prognostic. Toate acestea vor avea un impact asupra evoluției pacientului prin influențarea atitudinii terapeutice, dorind a crește speranța de viață a pacientelor.

Scopul acestui studiu este identificarea unor noi factori de prognostic, care să contribuie la completarea protocolului diagnostic cu un număr minim de teste care să evidențieze alterările principalelor căi patogenice și particularitățile mediului de dezvoltare al tumorii, permițând astfel aplicarea de terapii țintite ce determină în final un impact socio-economic pozitiv.

5. Metodologie generală

Acest studiu a fost realizat în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Apostol Andrei” Constanța. Au fost analizate cazurile pacientelor internate în perioada 1 ianuarie 2016 – 31 decembrie 2020 cu diagnosticul prezumptiv de tumoră uterină, în secțiile de Obstetrică și Ginecologie ale aceluiași spital.

Diagnosticul de tumoră musculară netedă s-a bazat pe caracteristicile macroscopice și microscopice tipice, precum și pe studiile imunohistochimice ce au contribuit la realizarea diagnosticului diferențial. În ceea ce privește cazurile care au beneficiat de examen extemporaneu, proba luată în considerare este piesa operatorie finală și nu cea trimisă spre examinarea intraoperatorie.

Piese de histerectomie totală și subtotală, însoțite sau nu de una ori ambele anexe uterine, fie doar părți ale acestora, precum și piesele de miomectomie trimise spre examinare morfologică au fost descrise macroscopic și prelucrate, pentru a obține rezultatul final: lama colorată cu Hematoxilină-Eozină.

Colorarea preparatelor se efectuează automat prin sistemul de colorare Diapath Giotto (Diapath S.P.A., Italia). Colorația uzuală este Hematoxilină-Eozină. În acest scop, soluțiile utilizate sunt Hemalaun Harris și Eozină-Floxină.

Lama astfel pregătită este examinată microscopic pentru evaluarea calității, a categoriei procesului lezional, localizarea acestuia, dar și dimensiunile, tipul histologic al tumorii, arhitectura, prezența și severitatea atipiilor cito-nucleare, prezența sau absența hemoragiei, prezența sau absența necrozei, activitatea mitotică și gradul de infiltrativitate, distanța față de marginile de rezecție chirurgicală.

În urma evaluării preparatelor microscopice, am selectat cele mai reprezentative blocuri de parafină pentru efectuarea testelor imunohistochimice. Blocurile de parafină au fost

secționare la microtom la grosimea de 4 μ m. Au fost utilizați markerii: p53, Rb1, PD-L1, CD8 și CD105. Fiecare set efectuat a fost acompaniat de lamă de control pozitivă.

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 PTEN în cazurile de leiomiosarcom, tumoră musculară netedă cu potențial malign incert, leiomiom cu nuclei bizari și leiomiom mitotic activ.

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. Aspecte clinico-morfologice ale tumorilor miocitare uterine benigne

6.1. Introducere

Fibroamele uterine, numite și leiomioame, sunt tumori benigne monoclonale, hormon-dependente, alcătuite din țesut muscular neted și țesut conjunctiv, cu dezvoltare la nivelul peretelui uterin.

Afectează peste 70% din femei până la instalarea menopauzei. Aproximativ 25% din femeile la vârsta reproductivă prezintă simptome suficient de severe pentru ca 25% dintre acestea să necesite tratament. Prevalența lor prezintă variații mari între studii, fiind cuprinsă între 4,5%-68,6%. Alte cercetări raportează o prevalență cuprinsă între 20-77%. Incidența estimată este între 5,4% și 77% la femeile fertile, în funcție de metoda diagnostică și populația studiată.

6.4. Rezultate

Vârsta medie în momentul diagnosticului a fost de 49,07 de ani, cu extreme între 23 și 88 de ani. Cele mai multe cazuri au fost identificate în decada a cincea de viață (48,59%). În ceea ce privește mediul de proveniență al pacientelor, s-a observat o frecvență crescută a celor din mediul urban (79,19%). Din punct de vedere histopatologic, cele mai multe cazuri au fost de leiomioame tipice (93,02%), iar cele mai rare tipuri identificate au fost de leiomiom apoplectic (0,24%) și de leiomiom intravenos (0,12%).

Cele mai multe leiomiome au fost identificate la nivel intramural (45,11%). S-au întâlnit numeroase cazuri în care au fost identificate mai multe leiomiome, dar și cazuri când localizarea acestora a cuprins mai multe tunici anatomice (submucos și intramural, intramural și subseros, toate localizările). În cazurile de miomectomie, datele despre topografia certă a leziunilor nu au fost documentate, aceste fiind raportate ca localizare neprecizată (12,42%).

Din punct de vedere al tehnicii de excizie a leziunilor, cele mai întâlnite procedee au fost de histerectomie totală cu anexectomie bilaterală (41,62%) sau miomectomie (17,63%). În 8,20% din cazuri s-a efectuat și evidare ganglionară.

Peste jumătate din femeile din lotul de studiu se aflau în perioada de premenopauză (65,36%). Cele mai frecvente comorbidități ale acestora au fost reprezentate de: hipertensiunea arterială (16,28%) și dislipidemie (11,02%). Diabetul zaharat a fost identificat în 9,91% din cazuri, însă doar 4,53% din femei au prezentat un indice de masă corporală de ≥ 30 .

Pe lângă comorbidități, în 64,29% din cazuri au fost identificate și alte patologii ale sferei ginecologice. Cele mai frecvente au fost: adenomioză (30,96%), cervicită cronică activă (14,82%) și polipi endometriali (14,26%).

Cele mai importante și frecvente semne și simptome care au determinat prezentarea la medic al pacientelor au fost: metroragia (62,06%), durerile pelvine (55,45%), menoragia (19,09%) și infertilitatea (1,10%).

Din punct de vedere biochimic, principalele informații sunt reprezentate de prezența unui sindrom inflamator în 34,03% din cazuri, precum și prezența anemiei (44,31% din cazuri), de cele mai multe ori de grad ușor (72,45%).

În ceea ce privește distribuția vârstei pe anii de studiu, am observat o frecvență ondulatorie ce indică o creștere etapizată a vârstei medii de diagnostic.

De asemenea, s-a remarcat o asociere semnificativă statistic a mediei diametrului maximal al leziunilor cu vârsta pacientelor. Prin urmare, o vârstă mai înaintată s-a asociat cu o medie a diametrului maximal mai redusă ($p < 0,001$), aceleași aspecte evidențiindu-se și pe decadele de vârstă ($p < 0,001$).

În funcție de statusul hormonal am observat corelații semnificative statistic ce constau în asocierea menopauzei cu leiomiomele tipice și a premenopauzei cu leiomiomele celulare, mitotic active și epitelioides ($p = 0,013$). De asemenea, prezența diabetului zaharat s-a asociat cu dezvoltarea leiomiomelor tipice ($p = 0,044$).

În ceea ce privește infertilitatea, acesta s-a asociat semnificativ statistic cu prezența menoragiei ($p = 0,016$) și cu absența afecțiunilor asociate patologiilor ginecologice ($p = 0,011$).

Celelalte manifestări clinice identificate s-au asociat cu prezența sindromului anemic ($p=0,019$), însă nu și cu gradul acesteia ($p=0,138$).

Alt aspect ce contribuie la întreținerea anemiei și a sindromului inflamator a fost identificat ca fiind prezența patologiei ginecologice asociate leiomioamelor ($p=0,008$, respectiv $p<0,001$). În cazul asocierii cu anemia, am observat corelații în legătură cu anemia moderată și severă ($p=0,017$).

6.5 Discuții

Leiomioamele uterine sunt cea mai frecventă tumoră a sistemului reproducător. Incidența acestora se consideră a fi mult mai mare decât în raportările din literatură, deoarece majoritatea pacienților sunt asimptomatice.

Printre factorii care duc la creșterea riscului de dezvoltare a acestor tumori se numără menarha timpurie, vârsta la prima sarcină și diferite afecțiuni reproductive. Pe de altă parte, factori asociați cu reducerea riscului sunt numărul mare de sarcini, vârsta avansată la prima naștere și cicluri menstruale regulate. Factorul cu cea mai mare influență asupra riscului de dezvoltare a leiomioamelor este vârsta, astfel încât riscul poate crește de până la zece ori în decadele 5 sau 6 comparativ cu decada 3. Acest efect nu se întâlnește după decada 6, evidențiind rolul protector al statusului menopauzal. Factorul cu cel mai mare rol protective este paritatea, aceasta fiind asociată cu reducerea de 5 ori a riscului de leiomioame uterine ce necesită tratament chirurgical. Efectele parității asupra prevalenței se pot explica prin modificările hormonale asociate sarcinii sau prin remodelarea miometrială ce are loc în timpul și după naștere.

S-a observat că hipertensiunea arterială crește riscul de leiomioame uterine. Au fost sugerate căi comune pentru hipertensiunea arterială și riscul de leiomioame uterine prin intermediul unor factori de creștere și peptide vaso-active, precum angiotensina II, endotelin-1, IGF-1, PDGF, TGF-beta și creatin kinaza. Există numeroase asemănări între hipertensiunea arterială și leiomioamele uterine: ambele se asociază cu o morbiditate secundară semnificativă, implică alterări ale fibrelor musculare netede. În acest studiu, prezența hipertensiunii arteriale s-a corelat cu prezența patologiei uterine și ovariene asociate ($p=0,004$), dar și cu diametrele scăzute ale leziunilor ($p<0,001$).

Cu privire la asocierea dintre dislipidemie și leiomioamele uterine, este bine cunoscut că estrogenii influențează mai multe aspecte ale metabolismului lipidic. Având în vedere faptul

că leiomiomioamele uterine sunt tumori estrogen-dependente, pare plauzibil să se emită o ipoteză între leiomiomioame și dezvoltarea bolilor metabolice. Ca în cazul obezității, principala asociere statistică a dislipidemiei a fost cu patologiiile genitale asociate ($p=0,047$).

În studiul efectuat de Bolde SA et al., principalele manifestări clinice au fost menoragia (48,58%) și durerile abdominale (38,43%). Baral RS et al. au identificat drept principale acuze: sângerările uterine anormale cu dureri abdominale joase în 39,6% dintre cazuri, dureri abdominale (34%), masă pelvină (8,4%). În studiul condus de Raza AM et al., manifestările clinice au fost reprezentate de menoragie (37,97%), dureri abdominale (18,99%), dismenoree (17,72%), infertilitate (1,27%).

În cazul studiului de față, principalele manifestări clinice au fost reprezentate de metroragie (62,06%) și de durerile pelvine (55,45%). Anemia a fost identificată la 44,31% din cazuri, majoritatea având forme ușoare (72,45%). De asemenea, menoragia a fost determinată strict de prezența leiomiomioamelor ($p<0.001$) în cazul persoanelor tinere. Motiv de prezentare la medic au fost și alte acuze, precum incontinența urinară, senzația de presiune la nivel pelvin.

În 2-3% dintre paciente, leiomiomioamele uterine pot reprezenta singura cauză a infertilității. Efectul acestei patologii asupra sarcinii depinde de localizare. În cazul leiomiomioamelor dezvoltate subseros nu s-a observat vreun impact asupra fertilității. Însă, leziunile cu localizare submucoasă sau intramurală deformează cavitatea uterină, astfel încât ratele de implantare, de sarcină și de naștere în cazul pacientelor ce au apelat la fertilizare in vitro sunt mai scăzute comparativ cu pacientele infertile fără a fi diagnosticate cu leiomiomioame uterine. S-a observat că indiferent de localizarea lor, ratele de sarcină clinică, implantare, evoluție a sarcinii și de nașteri vii sunt semnificativ mai mici. În plus, procentul de avort spontan este semnificativ mai mare la pacientele cu leiomiomioame uterine. Această idee este susținută și de rezultatele acestei cercetări, identificând o asociere semnificativă între infertilitate și absența altor patologii uterine sau ovariene asociate ($p=0,011$).

Cu privire la localizarea acestor tumori, în studiul lui Bolde SA et al., majoritatea cazurilor s-a localizat intramural (54,29%), apoi submucos (10%), subseros (4,28%), identificând un singur caz parasitic (1,43%). Geethamala K et al. au identificat 48,9% din cazuri dezvoltate intramural, urmate de 15,3% subseroase, 2,9% submucoase, iar 32,9% dintre cazuri au avut mai mult de o localizare.

Patologiile asociate leiomiomioamelor sunt variate, observând că în analiza efectuată de Geethamala K et al., majoritatea cazurilor nu a prezentat alte asocieri (74,6%). Cazurile ce au prezentat și alte leziuni, s-au asociat cu leiomiomioame cervicale (8,29%), chistadenoame seroase ovariene (5,99%), polipi endometriali (2,44%), chistadenoame mucinoase ovariene (1,58%) și

un caz de teratom ovarian matur (0,49%). În cadrul acestui studiu, în 64,29% din cazuri au fost identificate și alte patologii ale sferei ginecologice. Cele mai frecvente au fost: adenomioza (30,96%), cervicita cronică activă (14,82%) și polipii endometriali (14,26%). Printre cele mai rare patologii asociate se evidențiază câte un caz de: metastază ovariană, sarcoidoză uterină, struma ovari, tecom ovarian, adenocarcinom endocervical cu celule clare, hemangiom cavernos intramural uterin.

Opțiunile terapeutice includ medicația, precum sistemele intrauterine cu levonorgestrel, agoniștii GnRH; intervenția chirurgicală: histerectomie, miomectomie și procedurile minim invazive.

6.6 Concluzii

Vârsta medie în momentul diagnosticului a fost de 49,07 de ani (23 - 88 de ani), 48,59% din cazuri fiind identificate în decada a cincea de viață. În ceea ce privește distribuția vârstei pe anii de studiu, s-a identificat o frecvență ondulatorie ce indică o creștere etapizată a vârstei medii de diagnostic. În ceea ce privește infertilitatea, acesta s-a asociat semnificativ statistic cu absența afecțiunilor asociate patologiilor ginecologice ($p=0,011$). Din această caracteristică rezultă o cauză rară de infertilitate ce trebuie luată în considerare pentru îmbunătățirea condițiilor de viață.

7. Rolul patogenezei asociat cu microclimatul tumoral în diagnosticul diferențial al tumorilor miocitare uterine

7.1 Introducere

Din spectrul tumorilor mezenchimale uterine, tumorile musculare netede sunt cel mai comun diagnosticate. Principalii reprezentanți ai acestora sunt: leiomiomul, leiomiosarcomul și tumora musculară netedă cu potențial malign incert (STUMP). Celulele tumorale au abilitatea de a-și structura propriul climat din componentele gazdei, având denumirea de microclimat tumoral. Acesta face posibile dezvoltarea și eventuala metastazare a tumorii. Contribuția sa cheie este în diferențierea celulei neoplazice, epigenetica și diseminarea sa, dar și în eludarea sistemului imunitar.

7.4. Rezultate

Cazurile de tumori maligne au fost observate la o vârstă mai înaintată (decada a șasea), spre deosebire de celelalte cazuri (decada a cincea) ($p=0,007$).

Cele mai frecvente trei aspecte clinice au fost metroragia (65,22%), durerea pelvină (60,87%) și hipermenoreea (8,70%). Dintre acestea, s-a observat o corelație semnificativă statistic între prezența hipermenoreei și diagnosticul de STUMP ($p=0,012$). De asemenea, s-a observat un debut precoce al simptomelor (care a determinat o prezentare mai rapidă la medic) în cazul leiomiosarcoamelor comparativ cu celelalte entități tumorale ($p=0,001$).

Din punct de vedere chirurgical, majoritatea au fost tratate prin histerectomie totală (73,91%). Pe lângă tratamentul chirurgical, o treime dintre pacienții cu leiomiosarcom (13,04% din cazuri) au beneficiat și de tratament chimioterapeutic oncologic. La sfârșitul acestui studiu, 73,91% dintre pacienți au supraviețuit. Decesul a survenit doar la categoria pacientelor cu tumoră malignă ($p=0,008$). Supraviețuirea medie în aceste cazuri a fost de 25,67 luni, riscul relativ al acestor cazuri prin comparație fiind de 5,66 ($p<0,001$, CI-95: 2,02-15,82).

O diferență semnificativă statistic a fost observată în tehnica de abord chirurgical în raport cu localizarea leziunilor ($p=0,025$). S-a optat pentru histerectomie totală cu sau fără anexectomie bilaterală în cazul localizării intramurale și miomectomie în cazul localizării subseroase. De asemenea, a fost observată o asociere între diagnostic și localizare, constând într-o preponderență la nivel intramural a leziunilor maligne și a celor cu potențial malign incert ($p=0,014$). Pacienții care au prezentat localizarea intramurală a tumorii au avut o prezentare mai rapidă la medic (mai puțin de o săptămână), decât în celelalte localizări ($p=0,039$). La categoria pacientelor nulipare s-a identificat o asociere cu localizarea intramurală ($p=0,035$).

Examenul histopatologic a stabilit diagnosticul final, evidențiind în același timp și potențialul biologic al leziunilor. În cazul leiomiosarcoamelor, majoritatea cazurilor au fost diagnosticate în stadiul FIGO IB. S-a observat o supraviețuire crescută a pacienților cu FIGO IB (37,75 luni), comparativ cu stadiile IIB și IVB (două luni, respectiv o lună) ($p=0,028$). O treime din cazuri au prezentat invazie limfo-vasculară. Cu toate acestea, 77,78% din cazuri au prezentat metastaze. Prezența lor a fost asociată cu o medie scăzută de supraviețuire (30,60 luni vs o lună) ($p=0,025$).

Invazia limfo-vasculară a fost asociată cu: un număr crescut de mitoze ($p=0,001$), cu prezența necrozei ($p=0,020$), o medie crescută a diametrului maxim ($p=0,005$) și o densitate microvasculară crescută ($p=0,034$). Creșterea severității atipiilor nucleare a fost asociată cu

creșterea activității mitotice ($p=0,020$), precum și cu prezența hemoragiei ($p=0,032$). S-a observat o asociere semnificativă statistic între prezența hipertensiunii arteriale și prezența metastazelor ($p=0,005$).

Majoritatea cazurilor (73,91%) au prezentat o reacție p53 nulă. Imunoreacția la Rb1 a fost pozitivă în 56,52% din cazuri, numărul mediu de nuclei pozitivi identificați fiind de 21,52%. Diagnosticul de leiomiom activ mitotic a fost asociat cu imunopozitivitatea pentru RB1, în timp ce cel al leiomiomului cu nuclei bizare a fost asociat cu imunopozitivitatea pentru RB1 ($p=0,019$).

Imunoreactivitatea la PTEN a fost identificată în 34,78% din cazuri, identificând o diferență semnificativă statistic între diagnostic și imunoreacție ($p=0,009$). Din punct de vedere citogenetic, deleția genei PTEN a fost observată în 65,22% din cazuri.

Aceleași categorii de diagnostic care au prezentat atipii severe au fost asociate cu o imunoreacție negativă a PTEN ($p=0,034$). Deleția genei a fost asociată cu un FIGO ridicat ($p=0,002$). Starea nealterată a genei a fost asociată cu imunopozitivitatea markerului RB1 ($p=0,029$).

Prezența infiltratului inflamator CD8+ intratumoral a fost identificată în 82,61% din cazuri, cu o medie de 16,55/mm² celule pozitive. S-a observat o diferență semnificativă statistic între valoarea medie a infiltratului inflamator CD8 pozitiv și tipul tumorii. Cele mai multe reacții pozitive au fost observate în cazul leiomiosarcoamelor, urmate de leiomiom simplastic și STUMP ($p=0,025$).

Mai mult, media crescută a celulelor T CD8+ s-a corelat cu un procent crescut de nuclei RB1+ ($p=0,003$). În cazul tumorilor maligne și a celor cu potențial biologic incert, s-a observat o asociere cu severitatea atipiilor ($p=0,003$) și riscul de metastazare ($p=0,009$).

Imunoreacția PD-L1 la nivelul infiltratului inflamator tumoral a fost prezentă în 82,61% din cazuri, prezentând o medie de 1,17%.

În ceea ce privește densitatea microvasculară, s-a observat o medie de 5,54 vase/mm², fără o distribuție semnificativă statistic în funcție de diagnostic ($p=0,343$).

7.5 Discuții

Din sfera patologiilor ginecologice, cele mai frecvent diagnosticate tumori mezenchimale uterine sunt acelea cu originea la nivelul musculaturii netede, putând ridica

probleme de diagnostic diferențial. Mai cu precădere variantele tumorilor benigne se caracterizează prin aspecte morfologice ce pun probleme de diferențiere de leiomiosarcom, corespondentul malign.^[80] Pentru deosebirea subcategoriilor de leiomiom, STUMP și leiomiosarcom, evaluările imunohistochimice pot fi de ajutor, însă nu sunt suficient de specifice, astfel încât sunt necesare teste suplimentare.

Principalele căi implicate în patogeneza acestor leziuni tumorale sunt cele ale genelor TP53, RB1 și PTEN. Mutațiile genei TP53 au fost identificate în 0% leiomioame, 6-29% STUMP și 24-30% leiomiosarcoame. În cazul mutațiilor genei PTEN, acestea au fost observate în 5% dintre cazurile de leiomiom, 33% STUMP și 42-58% leiomiosarcoame. Studiul realizat de Astolfi et al. a inclus 216 cazuri de leiomiosarcom și a evidențiat că frecvența mutațiilor genei RB1 a fost de 48%. De asemenea, autorii au observat că mutațiile genei PTEN au fost mai frecvente în cazul metastazelor decât în tumorile primare. În studiul lor, mutațiile TP53 și RB1 au apărut concomitent, acestea din urmă având o semnificație prognostică favorabilă în cazurile cu mutații TP53 prezente.

Din punct de vedere molecular, leiomioamele sunt considerate neoplasme clonale separate, care apar independent de leiomiosarcom. Suprapunerea modificărilor genomice în cele două tumori anterior menționate sugerează că acestea se dezvoltă prin căi patogenice similare, primul fiind un precursor al leiomiosarcomului după dobândirea unor modificări suplimentare. Diferența dintre vârstele de apariție a celor două entități sugerează o potențială relație dependentă de timp. Rezultatele prezentului studiu sunt în concordanță cu această idee. Valorile parametrilor analizați sunt similare între leiomiosarcom, STUMP și leiomiomul atipic. De exemplu, s-a observat că frecvențele mutațiilor genelor TP53 și PTEN pentru leiomiosarcoame, STUMP și leiomiomul atipic au avut valori mai apropiate comparativ cu leiomiomul mitotic activ. De asemenea, diferența de vârstă dintre leiomiom cu nucleii bizari și leiomiosarcom a fost în medie de 9,56 ani, variind între 10-21 de ani.

Shanes ED et al. au studiat expresia PD-L1 în 49 de tumori musculare netede uterine: 11 leiomioame tipice, 7 leiomioame atipice, 8 STUMP și 23 leiomiosarcoame. Aceștia au observat că la nivelul celulelor imune asociate tumorii, reacția a fost prezentă în 78% din leiomiosarcoame, 25% din STUMP, 9% din leiomioamele tipice, fără a fi observată în leiomioamele atipice. Rezultatele obținute sugerează posibilitatea administrării imunoterapiei țintite la pacienții diagnosticați cu leiomiosarcom. În prezenta cercetare, am observat o reacție pozitivă a PD-L1 în toate cazurile evaluate: 88,89% din leiomiosarcoame, 66,67% din STUMP, 85,71% din leiomioame cu nucleii bizari și 75% din leiomioamele mitotic active.

CD105 favorizează tranziția epitelialo-mezenchimală. În cazul sarcoamelor, acest fenomen este în mare parte necunoscut și paradoxal, deoarece originea lor este mezenchimală. Sannino et al. au sugerat că celulele sarcomatoase se pot afla în stare metastatică și că diferențierea lor către un fenotip epitelial sau unul predominant mezenchimal depinde de contextul celular. Această caracteristică a fost corelată cu un fenotip agresiv.

Diabetul zaharat de tip 2 presupune un metabolism defectuos al glucozei secundar rezistenței la insulină. Această afecțiune este asociată cu o stare inflamatorie sistemică cronică, de intensitate redusă. Celulele maligne prezintă modificări în metabolismul glucozei și aminoacizilor ca răspuns la proliferarea celulară accelerată. S-a observat că diabetul zaharat este asociat cu o mortalitate crescută determinată orice cancer la 7% dintre bărbați și 11% dintre femei.

În microclimatul tumoral, limfocitele T nu reușesc să-și îndeplinească rolul antitumoral secundar activării lor cronice, stimulării inadecvate și absenței recunoașterii antigenului. De asemenea, există o reducere a glicolizei, sintezei de citokine și o scădere a activității căii mTOR în urma competiției metabolice dintre limfocitele T din infiltratul tumoral și celulele maligne. Studiile experimentale au arătat reducerea raportului respirație bazală/glicoliză, precum și afectarea rolurilor multiple ale limfocitelor T CD8+ PD-1+ în tumoră. S-a sugerat că dezvoltarea și progresul tumorilor sunt susținute de alterarea legăturii funcție imună-metabolism a limfocitelor T CD8+ PD-1+. În acest studiu, am observat o asocieri semnificativă între valoarea medie a limfocitelor T CD8+ și prezența diabetului zaharat ($p=0,012$).

7.6 Concluzii

Am identificat valori similare ale parametrilor studiați între leiomiosarcoame și leiomiomul cu nuclei bizari, ceea ce sugerează o posibilă evoluție a tumorii maligne dintr-un precursor benign, și anume leiomiomul simplastic, acest aspect deschizând perspective viitoare de cercetare.

8. Studiul comprehensiv al leiomiosarcoamelor și tumorilor musculare netede cu potențial malign incert

8.1. Introducere

Microclimatul tumoral este un mediu specializat, format din componentele gazdei și structurat de celulele tumorale pentru a menține dezvoltarea și metastazarea tumorii. Rolul acestuia este unul esențial pentru diferențierea neoplaziei, epigenetica acesteia, diseminare, dar și pentru eludarea sistemului imun.

Interacțiunea dinamică dintre celulele neoplazice maligne și componentele celulare ori acelulare ale microclimatului tumoral are un rol major în apariția heterogenității, a progresiei clonale și în dobândirea rezistenței la multiple substanțe utilizate în tratament. În timpul acestei interacțiuni, atât celulele tumorale, cât și cele stromale își pot schimba imunofenotipul odată cu evoluția tumorii.

Tumorile musculare netede cu potențial malign incert reprezintă o categorie tumorală extrem de rară, întâlnită în aproximativ 0,01% din piesele de histerectomie sau miomectomie. Patogeneza lor presupune teorii conform cărora acestea sunt fie tranziția de la un leiomiom la leiomiosarcom, fie un leiomiosarcom de grad scăzut nediagnosticat. Cel mai frecvent sunt diagnosticate la vârsta medie de 44 de ani, în perioada fertilă. Au capacitatea de a metastaza sau de a apărea recurențe în ciuda faptului că sunt considerate ca având un potențial malign scăzut. În literatură au fost raportate rate de recurență cuprinse între 7% și 27%, rata de recurență totală fiind de 11%.

Spre deosebire de acestea, leiomiosarcoamele uterine însumează 1-3% din totalul tumorilor maligne uterine și 30% din sarcoamele dezvoltate la acest nivel. Cele mai frecvente mutații întâlnite în aceste tumori sunt localizate la nivelul genelor: TP53 (30%), ATRX (25%), MED12 (20%). Prognosticul lor depinde de stadializarea FIGO. Supraviețuirea fără boală la 5 ani pentru stadiile I și II sunt de 75,8% și 60,1%. Pentru stadiile III și IV supraviețuirea este de 44,9% și 28,7%.

8.4. Rezultate

Vârsta medie totală a cazurilor identificate a fost de 52,17 ani, particularizând: pentru tumorile musculare netede cu potențial malign incert – 45 ani și pentru leiomiosarcoame – 54,56 ani.

A fost identificată o asociere semnificativă statistic între statusul hormonal și diagnostic și anume perioada menopauzală se asociază cu diagnosticul de leiomiosarcom, iar perioada premenopauzală cu cel de STUMP ($p=0,014$).

În ceea ce privește paritatea, pacientele fără sarcini au fost identificate în rândul celor diagnosticate cu tumoră musculară netedă malignă în procent de 55,5%, dintre cazurile diagnostic cu STUMP doar un caz neavând sarcini anterioare.

În nici unul dintre cazuri nu au fost identificate următoarele: tratamente hormonale sau oncologice anterioare (chimioterapie sau radioterapie), antecedente personale patologice și antecedente heredo-colaterale în sfera ginecologică. Însă, cele mai frecvente patologii asociate au fost: dislipidemia (58,3%), hipertensiunea arterială esențială (50%), diabetul zaharat de tip 2 (16,7%), afectarea funcției tiroidiene (16,6%).

În cazul ambelor patologii, principalele manifestări clinice ce au determinat prezentarea la spital au fost metroragia și durerea pelvină. S-au observat două asocieri semnificative statistic între semne și simptome și investigațiile paraclinice sanguine: dislipidemie – metroragie ($p=0,014$) și durerea pelvină – absența dislipidemiei ($p=0,040$).

Atipiile citologice severe au fost identificate doar în cazurile de leiomiosarcom, iar atipiile moderate au fost majoritar observate în cazurile de tumoră malignă. În nici unul dintre cazuri nu s-a identificat invazie perineurală, iar invazia spațiilor vasculo-limfatice a fost observată în 30% din cazurile cu diagnosticul de leiomiosarcom. La momentul diagnosticării, stadializarea FIGO a fost următoarea: FIGO IB 77,78%, FIGO IIB și FIGO IVB, ultimele două regăsindu-se în procent de 11,11% fiecare. În evoluție, 77,78% au dezvoltat metastaze.

S-a evidențiat o asociere semnificativă statistic între apariția metastazelor și tipul imunoexpresiei p53, astfel încât diseminarea la distanță a fost observată în toate cazurile cu supraexprimarea proteinei și în 66,6% din cazurile cu expresie nulă ($p=0,026$).

Analiza statistică a condus la identificarea unei asocieri semnificative între prezența imunoreacției markerului Rb1 și metastazare ($p=0,009$). În majoritatea cazurilor cu reacție prezentă, metastazarea nu a fost observată. Procentul de nuclei pozitivi s-a corelat semnificativ statistic cu stadializarea FIGO ($p=0,003$), cele mai mari procentaje evidențiindu-se în stadiile avansate ale bolii: stadiul IVB – 80% nuclei pozitivi, stadiul IIB – 90% nuclei pozitivi, stadiul IB – 0%-30% (medie de 7,14% nuclei pozitivi). Cazurile diagnosticate cu STUMP au prezentat reacție nucleară pozitivă, cu procente cuprinse între 10-60%, valoarea medie fiind de 36,67%.

În plus, s-a observat o asociere semnificativă a acestui parametru cu numărul mediu de limfocite T PD-L1+ ($p=0,005$), cele mai mari valori ale numărului mediu de limfocite T fiind în corelație cu valorile maxime ale procentului de nuclei RB1 pozitivi.

Studierea rezultatelor a evidențiat o asociere semnificativă statistic între prezența deleției și diametrul maxim al leziunilor ($p < 0,001$), dar și cu stadializarea FIGO ($p = 0,002$). În plus, numărul mediu de limfocite T PD-L1+ s-a corelat semnificativ cu expresia genică a PTEN ($p = 0,049$).

S-a observat o asociere semnificativă statistic între severitatea atipiilor și pozitivitatea markerului CD8 ($p = 0,024$). Numărul mediu de limfocite T CD8+ a fost mai mare în cazurile cu atipii severe, fiind urmate de cele cu atipii moderate și, în final, cele cu atipii reduse ($p = 0,043$).

Studierea infiltratului tumoral limfocitar a presupus și examinarea prezenței PD-L1. Numărul mediu de limfocitelor T PD-L1+ a fost cuprins între 0 și 3,4 limfocite% în cazurile de leiomiiosarcom, iar pentru diagnosticele de STUMP între 0 și 1,9%. Prezența imunoreacției pozitive s-a asociat semnificativ cu prezența limfocitelor CD8+ ($p = 0,016$), dar și cu atipiile ($p = 0,040$), valorile medii și maxime ale limfocitelor PD-L1+ fiind observate în cazurile cu atipii severe.

Numărul de luni până la deces s-a corelat semnificativ statistic, invers proporțional cu numărul acestor limfocite ($p = 0,043$). Cu cât decesul a survenit după un interval mai scurt de timp, cu atât numărul mediu al acestor limfocite a fost mai mare.

Evaluarea microvascularizației tumorale prin intermediul markerului CD105 a evidențiat valori cuprinse între 2,17 și 11,26 capilare raportate la mm^2 , cu o valoare medie de 6,44 pentru cazurile diagnosticate cu leiomiiosarcom și 6,93 în cazurile de STUMP. S-a observat faptul că în cazurile în care densitatea microvascularizației este crescută, s-a constatat prezența crescută a embolilor tumorali ($p = 0,034$).

8.5 Discuții

Tumorile musculare netede dezvoltate la nivelul corpului uterin cuprind o gamă ce variază de la leziuni benigne, reprezentate de leiomioame, până la tumori maligne (leiomiiosarcom). Există cazuri ce nu pot fi încadrate cu exactitate în criteriile diagnostice pentru tumoră benignă sau malignă, numite tumori musculare netede cu potențial malign incert. Evoluția acestei categorii este cea care determină potențialul biologic final.

Manifestările clinice ale STUMP nu sunt specifice, fiind asemănătoare cu cele determinate de leiomioame: metroragie, masă pelvină, durere pelvină. De asemenea, pot determina semne și simptome secundare anemiei sau fenomenelor de compresie. La momentul

diagnosticului, manifestările determinate de leiomiosarcoame sunt reprezentate de metroragie (56%), masă pelvină palpabilă (54%), durere abdominală (22%), dar și secreții vaginale anormale, polakiurie, constipație și mărirea de volum a abdomenului.

Diagnosticul de leiomiosarcom uterin se stabilește în baza atipiilor nucleare, a numărului de mitoze și a prezenței necrozei tumorale. Evaluarea tipului de necroză poate fi dificilă cu atât mai mult cu cât se prezintă sub formă de focare mici. Astfel, accentul ar trebui să cadă pe atipiile nucleare și numărul de mitoze. În cazul acestei cercetări, s-a observat o asocierie semnificativă statistic între severitatea atipiilor și diagnosticul microscopic ($p=0,033$). Mitozele trebuie cuantificate în 10 câmpuri microscopice HPF, cu o valoare de minim 10 mitoze. În acest studiu, numărul mediu de mitoze este de 15,56/10 HPF.

Legat de extinderea acestei tumori, embolii tumorale sunt un fenomen rar observat, fiind identificat în 10-20% din cazuri. Aceeași caracteristică a fost observată și în această cercetare în procent de 30%.

Perioada medie de apariție a recurențelor pentru cazurile de tumoră musculară netedă cu potențial malign incert este de 51 luni, variind între 15 luni și 9 ani. În cazul pacientelor cu acest diagnostic incluse în studiu, nu s-a identificat apariția recurențelor după o perioadă de urmărire de cel puțin 4 ani.

Choi J et al. susțin această idee, constatând în studiul lor că mutațiile *TP53* tind să reducă ratele de supraviețuire. Acest studiu este în concordanță cu aceste date, demonstrând că există o corelație între expresia mutanta a p53 și supraviețuirea pacientelor ($p=0,008$). S-a observat că pacientele cu supraexprimare a p53 au avut o supraviețuire de 32 luni, iar cele cu expresie mutantă de tip nul o supraviețuire medie de 22,5 luni.

Miller K et al., cele mai frecvente modificări genetice au fost ale genelor *TP53* (62%) și *RB1* (41%). Aceste aspecte au fost confirmate și de Chudasama P et al., ce a observat că mutațiile esențiale pentru dezvoltarea leiomiosarcomului sunt *TP53*, *RB1*, și *PTEN*.

Infiltratul tumoral limfocitar este definit de prezența limfocitelor killer specifice în microclimatul tumoral. Există studii care au demonstrat că prezența limfocitelor T CD8+ citotoxice este critică pentru controlul evoluției tumorale. Prezența acestora este legată de progresia favorabilă a câtorva neoplasme maligne. Acestea au funcția de a stopa creșterea tumorală prin abilitatea de a liza celulele tumorale folosind perforine, granzime, dar și alte citokine. Un exemplu este dat de carcinoamele endometriale în cazul cărora prezența acestor limfocite este asociată cu un prognostic mai bun.

Vargas AC et al. au studiat expresia PD-L1 în multiple sarcoame de părți moi, printre care și leiomiosarcoame, inclusiv cu localizare uterină. Aceștia au observat că infiltratul tumoral

limfocitar a fost absent în majoritatea cazurilor de leiomiiosarcom (83%), fără să identifice corelații semnificative între expresia PD-L1 și existența infiltratului tumoral limfocitar în aceste tumori. Mai mult, aceștia nu au studiat asocierile dintre aspectele clinico-morfologice și imunoexpresia PD-L1. Comparativ, în acest studiu, imunoreacția pozitivă s-a asociat semnificativ cu prezența limfocitelor CD8+ ($p=0,016$), dar și cu atipiile ($p=0,040$). În plus, imunoexpresia PD-L1 a fost evidențiată în toate cazurile evaluate, observând asocierea semnificativă a acesteia cu diametrul maxim al tumorilor ($p=0,048$), dar și cu stadiul FIGO ($p=0,002$).

Mitsui H et al. au studiat expresia CD105 în 21 de cazuri de leiomiiosarcom uterin. Aceștia au identificat 9 cazuri cu imunoexpresie pozitivă a acestui marker. Ei au observat că supraviețuirea per total, dar și cea fără boală a pacientelor din acest grup a fost semnificativ mai redusă comparativ cu cazurile fără exprimarea endoglin la nivel endotelial. Spre deosebire de aceștia, în studiul de față s-a observat o legătură direct proporțională, fără a exista o semnificație statistică între valoarea medie a capilarelor intratumorale CD105+ și numărul de luni până la deces. Cu cât numărul capilarelor pozitive a fost mai mare, cu atât decesul a survenit mai târziu în evoluția pacientelor.

8.6 Concluzii

Am identificat asocierea dintre pozitivitatea imunomarkerului Rb1 și valorile medii crescute ale celulelor inflamatorii pozitive PD-L1. De asemenea, deleția genei PTEN s-a asociat cu aceleași valori ridicate ale limfocitelor T PD-L1+. Mai mult, cu cât aceste valori au fost mai crescute, cu atât numărul de săptămâni până la deces a fost mai mic. Astfel, am subliniat valoarea relației procesului patogenetic cu microclimatul tumoral rezultat ce se răsfrânge în mod direct asupra prognosticului pacienților. Aceste date pe care le-am identificat evidențiază importanța triadei Rb1 pozitiv-deleția genei PTEN-valori crescute ale limfocitelor T PD-L1 pozitive care reprezintă un factor de prognostic negativ.

9. Concluzii finale

Am observat că spectrul tumorilor musculare netede uterine este unul extrem de variat, cu multiple subcategorii ale entităților lezionale benigne, dar și cu multiple asemănări între

diferitele neoplazii, indiferent de potențialul biologic. Aspectele clinice și imagistice ale acestor tumori sunt nespecifice, fără a se putea identifica caracteristici patognomonice. De asemenea, nu s-au identificat nici markeri serologici care să orienteze diagnosticul.

Consultând și literatura de specialitate am remarcat că principalele căi patogenice cunoscute cu rol în tumorigeneza și evoluția acestor neoplazii sunt genele TP53, PTEN și RB1. La nivelul acestora se identifică frecvent mutații (în special în leiomiosarcoame), iar în celelalte categorii lezionale, am evidențiat similarități ale procesului patogenetic între tumora malignă, leiomiomul simplastic și STUMP.

Principalele concluzii, pe care le-am identificat și le-am transpus în cadrul prezentei lucrări s-au răsfrânt asupra unui tablou morfologic complet al acestor entități tumorale, în identificarea de factori prognostici, dar și în completarea protocolului de diagnostic. Acestea sunt următoarele:

1. În cazul leiomiomelor:

- Am observat o creștere constantă anuală a numărului de cazuri diagnosticate, ceea ce impune sporirea frecvenței evaluării de rutină a pacientelor. Principalul rezultat constă în diagnosticarea timpurie a patologiei și în alegerea metodei terapeutice optime ce permite recuperarea cât mai rapidă a pacientelor.
- Am identificat o asociere semnificativă între prezența infertilității și diagnosticul de leiomiom, fără a exista influența altor patologii genitale asociate. Acest aspect suprapus cu creșterea continuă a numărului de cazuri impune implementarea unui program de screening ecografic pentru diagnosticul precoce al acestor leziuni. Această condiție atrage după sine opțiuni terapeutice cu invazivitate minimă, cu grade reduse sau absente de dizabilitate ce vor duce la o recuperare mai rapidă și costuri mai mici, toate acestea aducând beneficii în sănătatea publică;
- Cele două aspecte anterior menționate au implicații directe în diagnosticul precoce al celorlalte două categorii de tumori miometriale (STUMP și leiomiosarcom). Prin implementarea fie a unor programe de screening, fie a unor evaluări ecografice de rutină, șansele de diagnostic precoce al leiomiosarcoamelor și tumorilor musculare netede cu potențial malign incert cresc considerabil. Un alt beneficiu rezidă din diagnosticarea în stadii cât mai timpurii de boală, cu creșterea șanselor de supraviețuire prin excizie totală, preferabil înainte de instalarea metastazării.

2. În cazul entităților ce se pretează la diagnostic diferențial, reprezentate de formele particulare de leiomiom, STUMP și leiomiosarcom:

- Am identificat valori similare ale parametrilor studiați între leiomiosarcoame și leiomiomul cu nuclei bizari, ceea ce sugerează o posibilă evoluție a tumorii maligne dintr-un precursor benign, și anume leiomiomul simplastic, acest aspect deschizând perspective viitoare de cercetare;
- Caracteristica anterior menționată impune supravegherea frecventă a pacienților diagnosticate cu leiomiom simplastic, mai ales dacă tratamentul a presupus miomectomie sau histerectomie subtotală. Principalul scop este diagnosticul precoce al leiomiosarcomului, ce duce la creșterea impactului socio-economic și al sănătății femeii;

3. În cazul leziunilor cu potențial biologic incert sau malign (leiomiosarcoame și STUMP):

- Am identificat asocierea dintre pozitivitatea imunomarkerului RB1 și valorile medii crescute ale celulelor inflamatorii pozitive PD-L1. De asemenea, deleția genei PTEN s-a asociat cu aceleași valori ridicate ale limfocitelor T PD-L1+. Mai mult, cu cât aceste valori au fost mai crescute, cu atât numărul de săptămâni până la deces a fost mai mic. Astfel, am subliniat valoarea relației procesului patogenetic cu microclimatul tumoral rezultat ce se răsfrânge în mod direct asupra prognosticului pacienților. Aceste date pe care le-am identificat evidențiază importanța triadei RB1 pozitiv-deleția genei PTEN-valori crescute ale limfocitelor T PD-L1 pozitive care reprezintă un factor de prognostic negativ.
- Am observat corelarea valorilor mari ale limfocitelor CD8+ și PD-L1+ cu prezența atipiilor severe. Astfel, CD8 reprezintă un marker al agresivității tumorale.

4. Respectând aspectele rezultate în urma cercetării persoanele, anterior menționate, este esențială îmbunătățirea protocolului de diagnostic după cum urmează:

- Impunerea în protocolul de diagnostic histopatologic al unor markeri ce se fac indispensabili pentru următoarele caracteristici:
 - o Endoglin/CD105 – rol în evaluarea microvascularizației și administrarea de terapii anti-angiogenice;
 - o RB1 – rol în patogeneză și evoluție tumorală;
 - o PD-L1 – rol în agresivitate, aprecierea supraviețuirii, administrarea de tratamente țintite anti-PD-L1;
 - o PTEN – studiu citogenetic sau la alternativ imunohistochimic, cu rol în agresivitate, în aprecierea prognosticului și în administrarea unor tratamente cu inhibitori PTEN.

10. Originalitatea tezei

Originalitatea prezentei cercetări derivă din abordarea interdisciplinară a tumorilor musculare netede dezvoltate la nivelul corpului uterin, evaluarea acestor neoplazii prin prisma parametrilor clinici și morfologici (histopatologic, imunohistochimic, genetic), introducerea în protocolul standard a evaluării de rutină a microclimatului tumoral, cu accent pe cuantificarea densității microvascularizației, în vederea posibilităților terapeutice țintite anti-angiogenetice și/sau anti-PD-L1.

În urma studierii literaturii de specialitate, am observat că la nivel național nu a fost cercetată această patologie într-o astfel de manieră. De asemenea, raportarea la nivel internațional a rezultatelor prezentei cercetări evidențiază originalitatea și caracterul de actualitate ale acestora.

Rezultatele studiilor prezentate au o mare adresabilitate atât pentru practica medicală, cât și pentru sfera viitoarelor cercetări, evidențiind rolul esențial al colaborării interdisciplinare (ginecolog, anatomopatolog, genetician, oncolog) prin aspectele variate (clinice, paraclinice, morfologice) ale temei în cauză.

Perspectivile viitoare de cercetare ce derivă din această lucrare sunt reprezentate de evaluarea influenței căilor patogenice asupra anumitor particularități ale microclimatului tumoral, toate acestea în asociere cu aplicarea de tratamente țintite în funcție de parametrii cu rol de factori prognostici identificați ce pot afecta supraviețuirea pacienților.