

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

***INVESTIGAȚII IMUNOHISTOCHIMICE ALE
FRONTULUI TUMORAL INVAZIV ȘI REACȚIA
STROMALĂ PERITUMORALĂ ÎN
ADENOCARCINOMUL PULMONAR***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

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

**Student-doctorand:
MIHAI ANDREEA ELENA**

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Introducere.....	7
PARTEA GENERALĂ	
CAPITOLUL 1. Elemente de anatomie și histologie a plămânului.....	11
CAPITOLUL 2. Cancerul pulmonar	16
2.1. Caractere generale ale bolii neoplazice.....	16
2.2. Incidența și prevalența cancerului pulmonar în România.....	18
2.3. Leziuni preinvazive în adenocarcinomul pulmonar.....	19
2.4. Evoluția naturală a bolii.....	21
2.5. Clasificarea histologică OMS (2015) a tumorilor pulmonare.....	21
2.6. Algoritm de diagnostic histopatologic în cancerul pulmonar.....	25
CAPITOLUL 3. Imunohistochimia, între rutină și cercetare	26
3.1. Imunohistochimia, scurt istoric.....	26
3.2. Imunohistochimia, scop, metode și limite.....	27
3.3. Rolul imunohistochimiei în diagnosticul și tratamentul cancerului pulmonar..	30
3.4. Imunohistochimia ca instrument de cercetare în adenocarcinomul pulmonar.....	33
CAPITOLUL 4. Stroma tumorală în adenocarcinomul pulmonar.....	34
4.1. Principalele componente celulare ale stromei tumorale.....	35
4.1.1. Fibroblastele asociate cancerului.....	35
4.1.2. Celulele endoteliale în stroma tumorală.....	38
4.1.3. Celule inflamatorii asociate cancerului.....	38
4.1.3.1. Limfocite intratumorale.....	39
4.1.3.2. Macrofage intratumorale.....	41
4.1.3.3. Celulele dendritice intratumorale.....	42
4.1.3.4. Neutrofile intratumorale.....	42
4.1.3.5. Celule NK intratumorale.....	43

4.1.3.6. Mastocite intratumorale	43
4.2. Ipoteze asupra factorilor trigger și agenților chemotaxiei responsabili de prezența TILs în cancerul pulmonar.....	44
CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL 5. Studiu histologic asupra stromei tumorale și investigații imunohistochimice ale limfocitelor intratumorale și peritumorale în 26 de cazuri de adenocarcinom pulmonar.....	48
5.1. Obiectivele studiului	48
5.2. Material si metodă	48
5.2.1. Materiale utilizate.....	50
5.2.2. Tehnica de lucru.....	50
5.3. Rezultate.....	54
CAPITOLUL 6. Interpretarea rezultatelor.....	56
6.1 Prelucrare statistică și reprezentări grafice.....	56
6.2. Discuții	98
6.3. Concluzii.....	108
Bibliografie	111
Anexe.....	134

Lucrarea de față abordează problematica inflamației cronice locale asociată adenocarcinomului pulmonar. Prezența celulelor inflamatorii în țesutul transformat tumoral a suscitât ideea că sistemul imunitar este implicat în destinul bolii canceroase și primele studii au evidențiat efecte contradictorii ale celulelor inflamatorii intratumorale asupra prognosticului bolii, în unele cazuri accelerând boala, altele încetinindu-o. Dintre populațiile de celule inflamatorii asociate cancerului, cele mai intens studiate sunt celulele dendritice, cu rol de prezentare a antigenului, limfocitele intratumorale, macrofagele asociate cancerului și celulele NK.

Astăzi știm că celulele tumorale și fibroblastele stromale asociate cancerului eliberează în micromediul tumoral semnale sub formă de citokine care inhibă activarea, durata de viață și proprietățile citotoxice ale celulelor inflamatorii. Pe baza acestor cunoștințe s-au dezvoltat compuși farmaceutici de sinteză care combat acțiunea imuno-inhibitoare din micromediul tumoral și redau limfocitelor proprietățile imunitare. Actualmente, se utilizează compuși care acționează asupra a două căi de semnalizare intercelulară PD1/PD-L1 (moarte programată 1 / ligandul pentru moarte programată 1) și CTLA4 (proteina 4 asociată limfocitului T citotoxic), și reprezintă principalele forme aprobate de imunoterapie oncologică.

Introducere

Motivația pentru această lucrare o constituie investigarea subtipului de limfocite intratumorale în raport cu prezența reacției stromale, distribuția topografică a acestora cu accent asupra limfocitelor peritumorale și frecvența lor după stadiul bolii. Deși se cunoaște că majoritatea limfocitelor intratumorale (TILs) sunt limfocite T, ne-am propus să identificăm localizarea acestora în tumoră, până acum majoritatea studiilor investigând numai limfocitele stromale și pe cele din imediata proximitate a celulelor tumorale, deși în toate cazurile se observă și la nivelul frontului invaziv, peritumoral, prezența limfocitelor, care au fost de obicei subsumate limfocitelor stromale intratumorale. Am plecat de la premisa că micromediul de la nivelul frontului invaziv diferă de zona centrală a tumorii și ne-am propus să desfășurăm o analiză comparativă a limfocitelor T peritumorale și restul limfocitelor intratumorale, care să ne ofere indicii despre factorii trigger. În absența unei corelații, studii ulterioare pot investiga diferențe la nivelul factorilor locali de modulare, ceea ce poate influența abordarea tratamentelor ținute pe baza principiilor imunoterapiei și să elucideze posibilități de amplificare a chemotaxiei în vederea creșterii numărului de limfocite intratumorale.

Lucrarea este structurată pe șase capitole, primele patru cuprinzând partea generală, în care am sintetizat stadiul cunoștințelor actuale în problematica dezbătută după nivelul propriu de înțelegere iar capitolele cinci și șase conțin contribuțiile personale.

Stadiul actual al cunoașterii

În primul capitol al lucrării am trecut în revistă anatomia și histologia plămânilor, începând cu reperele anatomice macroscopice și terminând cu structura histologică și morfologia celulară a principalelor tipuri de celulele prezente la nivelul arborelui respirator.

Al doilea capitol cuprinde noțiuni generale despre boala neoplazică, date epidemiologice despre incidența și mortalitatea prin cancer pulmonar în lume și în România în perioada 1990-2013 și informații despre carcinogenii implicați în apariția cancerului pulmonar, între care fumatul ocupă locul întâi [1,2]; am enumerat și descris leziunile preinvasive ale cancerului pulmonar conform clasificării OMS din 2105 [3], evoluția naturală a bolii și clasificarea histologică OMS a tumorilor pulmonare [3]. La finalul capitolului am inclus algoritmul de diagnostic histopatologic pentru cancerul pulmonar primitiv pe piesa de biopsie și pe specimenul chirurgical, cu evidențierea necesității testelor suplimentare imunohistochimice atunci când criteriile histologice nu îndeplinesc criteriile pentru identificarea cu certitudine a subtipului tumoral.

În al treilea capitol, “Imunohistochimia, între rutină și cercetare”, am efectuat mai întâi o retrospectivă istorică a principalelor etape experimentale științifice prin care s-au descoperit și consolidat conceptele de “anticorp” și “reacție imuno-enzimatică”, elementele de bază pe care funcționează imunohistochimia [4-6]. În partea de mijloc am redat principiul de funcționare al imunohistochimiei, am făcut o scurtă trecere în revistă a utilității, metodei și limitelor imunohistochimiei și am enumerat sumar etapele tehnice pentru obținerea anticorpilor monoclonali specifici [7]. În ultimele secțiuni ale celui de-al treilea capitol am menționat recomandările ghidurilor internaționale [8,9] privind rolul și indicațiile imunohistochimiei în activitatea medicală de rutină în diagnosticul și orientarea tratamentului cancerului pulmonar.

Al patrulea capitol tratează despre stroma tumorală în adenocarcinomul pulmonar, cu accent asupra componentelor ei celulare. Am descris fenotipul fibroblastelor asociate cancerului și rolurile lor principale: remodelarea matricei extracelulare prin enzime proteolitice, sinteza și exportul de colagen sub acțiunea hipoxiei, precum și activitatea lor de promovare a inflamației cronice nespecifice intratumorale prin eliberare de citokine proinflamatorii. Sunt enumerate principalele tipuri de celule inflamatorii asociate cancerului, macrofage, limfocite, neutrofile, celule dendritice, celule NK și mastocite, menționând pentru

fiecare dintre acestea markerii imunohistochimici prin care se identifică și impactul lor asupra prognosticului. Este de remarcat că majoritatea tipurilor de celule inflamatorii au o valoare prognostică ambiguă, studiile oferind rezultate contradictorii, ceea ce demonstrează că procesul neoplazic și inflamația locală asociată sunt un fenomen dinamic și că heterogenitatea celulelor tumorale la nivel energo-metabolic și genetic antrenează o reacție inflamatorie cu grad ridicat de entropie și complexitate. Am detaliat subtipurile de limfocite și macrofage intratumorale datorită faptului că sunt cele mai numeroase dar și pentru că tema principală de cercetare a acestei lucrări vizează subtipurile și distribuția limfocitelor asociate adenocarcinomului pulmonar.

Tot în capitolul patru este menționată diversitatea citokinelor din micromediul tumoral cu efectele lor contradictorii, unele în favoarea creșterii tumorale și altele cu efect de sensibilizare a limfocitelor citotoxice la celulele transformate neoplazic. IL 10, TGF β , IL 18, factorul inhibitor de migrare al macrofagelor (MIF), IL 8 și CXCL 12 sunt asociate cu progresia bolii. Citokinele proinflamatorii IL 2, IFN γ , IL 12, HLA-DR, și IL 23 asociate cu prelungirea supraviețuirii. IL 6 și TNF α , au rol ambivalent [10, 11].

Ultimul subcapitolul al părții generale constituie o analiză țintită asupra cunoștințelor actuale despre factorii chemotactici din micromediul tumoral cu rol în recrutarea limfocitelor intratumorale și factorii solubili modulatori ai activității acestora. Tot aici am menționat dovezile care mențin ipoteza imunoreactivității în boala neoplazică, acestea fiind demonstrate în alte boli neoplazice decât adenocarcinomul pulmonar. Melanomul este principalul reprezentant al cancerelor pentru care s-au identificat antigene tumorale cum sunt MART1 (antigenul asociat melanomului recunoscut de celulele T), NY-ESO1 (New York – antigenul pentru cancer esofagian 1) și MAGE A3 (antigenul A3 asociat melanomului) [12,13]. În ceea ce privește adenocarcinomul pulmonar, deși intratumoral sunt prezente limfocite citotoxice, identificarea unor antigene tumorale a eșuat.

Contribuții personale

În capitolul cinci am efectuat un studiu histologic asupra stromei tumorale și investigații imunohistochimice ale limfocitelor intratumorale și peritumorale în 26 de cazuri de adenocarcinom pulmonar.

Obiectivele studiului:

- Evaluarea semicantitativă a prezenței și distribuției topografice a limfocitelor T intratumorale în adenocarcinomul pulmonar, în funcție de stadiul bolii.

- Evaluarea semicantitativă a prezenței și distribuției topografice a limfocitelor T la nivelul frontului invaziv tumoral în adenocarcinomul pulmonar, comparativ cu limfocitele T intratumorale.

- Investigarea unei posibile corelații între pozitivitatea Cyclin D1 în celulele tumorale și prezența limfocitelor T intratumorale în adenocarcinomul pulmonar.

- Evaluarea reacției stromale desmoplazice în funcție de frecvența și distribuția limfocitelor T intratumorale în adenocarcinomul pulmonar.

- Investigarea unei posibile corelații între prezența macrofagelor intratumorale și a limfocitelor peritumorale și intratumorale.

Lotul de studiu a inclus un eșantion de 26 de pacienți cu adenocarcinom pulmonar dintre cele 43 de cazuri de adenocarcinom pulmonar care au fost diagnosticate și operate chirurgical în Spitalul Universitar de Urgență București între ianuarie 2013 și iunie 2016.

Material și metodă:

- lamele histologice colorate cu hematoxină-eozină din arhiva spitalului, corespunzătoare celor 26 de pacienți.
- 26 de blocuri histologice de parafină, cu material tisular recoltat din zona de invazie a adenocarcinomului pulmonar: tumoră și parenchim pulmonar adiacent.
- anticorpi monoclonali ready-to-use: CD3, CD8, CD68, Cyclin D1 (Producător Biocare Medical, CA, USA)
- microscop optic Nikon Eclipse 200
- pentru prelucrarea statistică a datelor am utilizat programul IBM SPSS v. 20 și Microsoft Office Excell 2007

Rezultatele au fost organizate în tabel conform criteriilor de evaluare.

Criterii de evaluare ale parametrilor investigați:

R.S = reacție stromală;

- 0= reacție stromală absentă;
- 1= septuri subțiri (cu diametrul 3-20 μm) și discontinue de fibroză;
- 2 = septuri subțiri (cu diametrul 3-20 μm) de fibroză în întreaga suprafață tumorală examinată;
- 3= septuri groase (cu diametrul >20 μm) de fibroză

TILs CD3+:

- ➔ pT = limfocite peritumorale – limfocite localizate la nivelul frontului tumoral invaziv

- ➔ TILs st = limfocite stromale – limfocite localizate în țesutul conjunctiv intratumoral
- ➔ TILs prT – limfocite proxim tumorale – limfocite localizate printre celulele tumorale sau în lumenele glandulare tumorale

Categorii TILs pT și TILs st:

- ➔ A: < 200 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ B: 200-500 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ C: > 500 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x

Categorii TILs prT:

- ➔ A: < 20 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ B: 20-100 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ C: > 100 limfocite / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x

Categorii CD68:

- ➔ A: < 20 de celule stromale pozitive pe 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ B: 20-100 celule stromale pozitive / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x
- ➔ C: > 100 celule stromale / 10 câmpuri microscopice consecutive, la obiectiv 40x

Categorii necroză (Nec)

- 0 = absentă
- 1 = necroză focală; nici o arie de necroză nu ocupă mai mult de un câmp microscopic la obiectiv mare (40x)
- 2= necroză frecventă; cea mai mare arie de necroză ocupă între 1 și 2.5 câmpuri microscopice la obiectiv mare
- 3= necroză marcată; cea mai mare arie de necroză ocupa mai mult de 2.5 câmpuri microscopice la obiectiv mare

Cyc D1 – am investigat procentul de celule tumorale pozitive la coloratia imunohistochimică pentru Cyclin D1

Am obținut că pe toate secțiunile, peste 90% dintre celulele inflamatorii mononucleare limfoide peritumorale și intratumorale sunt pozitive la CD3. Numai un procent între 5% și 10% sunt pozitive pentru CD8. Categoriile de frecvență a limfocitelor CD3 + se suprapun peste categoriile de frecvență ale celulelor inflamatorii mononucleare limfoide numărate pe secțiunile de hematoxină-eozină.

Tabel rezultate

	varsta	Stadiu	pattern	Grad	R.S	TILs pT	TILs st	TILs prT	CD 68 (%)	Nec	Cycl in D1
1	43	IV	mixt	G3	2	B	C	B	B	3	5
2	57	IA	mixt	G2	1	B	C	A	A	0	45
3	47	IIA	mixt	G3	1	A	A	A	A	0	75
4	81	IA	acinar	G1	2	B	C	A	C	1	60
5	61	IIB	acinar	G2	2	B	B	A	C	3	75
6	67	I A	mixt	G2	3	A	A	A	B	1	75
7	48	IIB	mixt	G3	1	A	B	B	A	3	50
8	61	IA	mixt	G3	2	C	C	B	B	1	65
9	62	III	mixt	G2	2	B	B	A	B	1	80
10	59	IB	acinar	G2	2	C	B	A	C	3	60
11	75	IA	mixt	G1	3	A	B	A	C	1	95
12	65	IIIB	mixt	G3	2	C	B	A	C	3	30
13	64	IV	mixt	G2	1	A	B	A	C	0	20
14	64	IB	acinar	G2	2	C	C	C	B	1	5
15	62	IIIB	mixt	G3	2	C	B	A	C	2	30
16	67	IA	mixt	G2	1	A	B	A	B	1	95
17	57	IB	mixt	G3	3	C	C	B	C	3	20
18	62	IIB	mixt	G3	1	C	B	A	C	1	5
19	46	IA	mixt	G3	2	B	B	B	C	2	35
20	62	IB	acinar	G2	2	A	A	A	C	2	35
21	70	IA	acinar	G1	1	A	B	A	A	1	5
22	59	IA	mixt	G3	2	C	C	C	C	2	75
23	70	IV	acinar	G2	1	A	B	A	C	0	85
24	56	I	acinar	G2	1	B	B	A	C	1	5
25	68	IIA	acinar	G2	3	C	C	C	C	3	10
26	70	IV	acinar	G3	3	C	C	A	C	3	15

În capitolul șase am efectuat prelucrarea statistică, reprezentarea grafică și interpretarea rezultatelor.

Am observat că privind limfocitele stromale, predomină categoria de frecvență medie (200-500 limfocite / 10 câmpuri microscopice) la 53% dintre pacienți. Limfocitele peritumorale sunt în cantitate variabilă, fiind reprezentate aproximativ proporțional toate categoriile de frecvență (35% rare, 27% cantitate medie, 38% cantitate abundentă) în lotul studiat. Limfocitele proxim tumorale sunt cel mai slab reprezentate, 69% dintre pacienți având < 20 limfocite proxim tumorale /10 câmpuri microscopice.

Am obținut că limfocitele peritumorale sunt rare în majoritatea cazurilor cu reacție stromală minimă. Cantitatea maximă de limfocite peritumorale se obsevă în cazurile cu reacție stromală medie.

Limfocitele stromale sunt 200-500 limfocite / 10 câmpuri microscopice la 54% din totalul pacienților. Din totalul limfocitelor investigate, cele mai multe sunt prezente la nivelul stromei.

Limfocitele proxim tumorale sunt preponderent rare, indiferent de intensitatea reacției stromale.

În cazurile când limfocitele stromale sunt > 500 limfocite / 10 câmpuri microscopice, limfocitele peritumorale sunt > 200 limfocite / 10 câmpuri microscopice. Am observat un raport 1:1 între limfocitele peritumorale și cele stromale la 13 pacienți (50% din lot), un raport de aproximativ 2:5 între limfocitele peritumorale și cele stromale la 3 pacienți, un raport inversat 5:2 între limfocitele peritumorale și cele stromale la 4 pacienți și un raport e aproximativ 1:3 la 6 pacienți.

Limfocitele proxim tumorale față de limfocitele stromale sunt in raport mai mic de 1:20 la 15 pacienți și un raport maxim de aproximativ 1:5 la 3 pacienți. Limfocitele proxim tumorale sunt cel mai slab reprezentate dintre toate categoriile de limfocite după distribuția topografică.

În ceea ce privește macrofagele, identificate prin CD68, în toate stadiile de boală predomină > 20 macrofage CD68+ / 10 câmpuri microscopice (85% din lotul de studiu), iar în stadiile tardive de boală, III și IV, nu se observă cazuri cu macrofage rare, sugerând că odată cu progresia bolii, se acumulează și macrofagele intratumorale. Cele mai multe macrofage sunt prezente în cazurile cu reacție stromală moderată, similar limfocitelor stromale.

Atunci când necroza tumorală ocupă > de 1 câmp microscopic, rareori (2 din 22 de pacienți) macrofagele intratumorale sunt < 20 / 10 câmpuri mciroscopice, în majoritatea

cazurilor (14 din 22 de pacienți) observându-se prezența a >100 macrofage CD68+ / 10 câmpuri microscopice. Acest fapt susține rolul trigger al necrozei pentru recrutarea intratumorală de macrofage CD68+.

Investigațiile privind pozitivitate Cyclin D1 în celulele tumorale au relevat că pozitivitatea cyclin D1 scade odată cu creșterea numărului de limfocite peritumorale. Atunci când limfocitele peritumorale sunt rare, media pozitivității Cyclin D1 este de 59% dintre celulele tumorale, cu variații între 25% și 90% în timp ce la creșterea numărului de limfocite peritumorale la >500 limfocite / 10 câmpuri microscopice, Cyclin D1 este pozitiv într-o medie de 31,5% dintre celulele tumorale, cu variații între 5% și 60%.

Între pozitivitatea Cyclin D1 și TIL stromale se observă o corelație invers proporțională. Atunci când limfocitele stromale sunt < 200 / 10 câmpuri microscopice, cyclin D1 are o medie de pozitivitate de 61,7% dintre celulele tumorale, urmând ca la categoriile frecvență medie respectiv abundentă a limfocitelor stromale, Cyclin D1 să scadă la medii de pozitivitate de 48% și respectiv 33%.

Prezența macrofagelor intratumorale s-a corelat negativ cu perioada de monitorizare. La pacienții cu macrofage intratumorale abundente, perioada medie de monitorizare este 5,8 luni, în timp ce macrofagele intratumorale rare se asociază cu perioadă de monitorizare medie de 33 de luni. De asemenea, prezența necrozei se corelează negativ cu perioada de monitorizare, pacienții fără necroză tumorală având cea mai îndelungată perioadă de monitorizare, cu o medie de 27 de luni. Prezența chiar redusă a necrozei, pe < 1 câmp microscopic, reduce drastic perioada de monitorizare la aproximativ 12 luni, iar în cazurile când necroza tumorală ocupă >1 câmp microscopic, perioada medie de monitorizare se reduce sub 12 luni.

Diferența semnificativă între categoriile de frecvență a limfocitelor și perioada de monitorizare am obținut numai pentru limfocitele peritumorale, unde prezența redusă sau în cantitate medie a limfocitelor s-a asociat cu o perioadă de monitorizare de 14,7 respectiv 22,1 luni. Atunci când limfocitele peritumorale erau abundente, perioada medie de monitorizare înregistrată a fost de 5,9 luni.

În subcapitolul doi al capitolului șase, la secțiunea ”**Discuții**”, am analizat rezultatele obținute pentru parametrii investigați și le-am comparat cu datele din literatură.

Fibroblastele asociate cancerului au rol chemotactic principal pentru recrutarea celulelor inflamatorii intratumorale. În studiul nostru limfocitele stromale s-au asociat pozitiv cu prezența reacției stromale. Sub influența hipoxiei, reacția stromală crește și se evidențiază benzi interstițiale de colagen. Mai multe studii susțin rolul protumoral al stromei tumorale,

prin acțiuni de susținere și suport vital către celulele tumorale prin angiogeneză, imunomodulare și liza matricei extracelulare în vederea expansiunii celulelor neoplazice [14-15]. Acest lucru sugerează că hipoxia accentuată, care în centrul tumoral induce desmoplazie, la nivelul frontului invaziv nu induce un efect chemotactic semnificativ pentru TILs peritumorale, în timp ce frecvența TILs stromale crește semnificativ, astfel că cel mai probabil factorii trigger și chemoatracțanți pentru TILs pT și TILs stromale diferă. Este de luat în considerare și faptul că limfocitele peritumorale vin în contact cu celule normale din țesutul imediat învecinat cancerului, unde difuzează o parte chemokinele din micromediul tumoral în funcție de turn-over-ul acestora.

În studiul nostru rezultatele indică prognostic negativ pentru necroză, similar cu alte studii și metaanalize din literatură [16, 17]. Macrofagele intratumorale CD68+ s-au corelat cu negativ cu perioada de monitorizare a pacienților, sugerând curs accelerat al bolii. În literatură, studiile au dat rezultate contradictorii [18-20].

Concluzii:

Toate adenocarcinoamele pulmonare invazive asociază prezența reacției stromale încă de la începutul bolii. Reacția stromală este cauzată de remodelarea matricei extracelulare și este o dovadă a invazivității celulelor neoplazice. Componenta celulară obligatorie a stromei tumorale sunt fibroblastele asociate cancerului. Componentele neobligatorii dar prezente în număr foarte variabil, uneori absente pe unele porțiuni, sunt limfocitele și macrofagele asociate cancerului.

În adenocarcinomul pulmonar, chiar și în stadiile avansate, predomină reacția stromală celulară cu desmoplazie minimă sau medie, rareori fiind prezente benzi groase de colagen.

Reacția stromală medie se asociază cu număr crescut de limfocite intratumorale și peritumorale.

Patternul histologic mixt este cel mai frecvent în adenocarcinoamele studiate.

Frecvența limfocitelor stromale și peritumorale nu diferă între patternul acinar sau mixt pentru adenocarcinoamele pulmonare studiate.

Prezența neomogenă a stromei, a celulelor inflamatorii intratumorale și pozitivitatea variabilă a Cyclin D1 în celulele tumorale sugerează compartimentalizare intratumorală, stroma alcătuind un biotop tumoral.

85% dintre adenocarcinoamele pulmonare studiate conțin zone de necroză tumorală. Necroza tumorală se corelează pozitiv cu prezența macrofagelor intratumorale. Macrofagele intratumorale sunt numeroase în prezența necrozei, dar pot fi numeroase și în absența acesteia,

susținând polarizarea fenotipului macrofagelor asociate cancerului în M1 antitumoral și M2 inflamator protumoral în funcție de factorul trigger.

Necroza tumorală și cantitatea de macrofage CD68+ se asociază negativ cu perioada de monitorizare și prezentarea la medic a pacienților, sugerând curs accelerat al bolii.

Dintre limfocitele asociate cancerului, în adenocarcinoamele pulmonare investigate în acest studiu, > 90% sunt limfocite CD3+. Dintre acestea numai 5-10 % sunt și CD8+.

Dintre limfocitele peritumorale, stromale și proxim tumorale, limfocitele stromale sunt cel mai bine reprezentate în toate stadiile de boală și pot fi prezente în număr crescut încă de la început. Limfocitele proxim tumorale, situate în imediata vecinătate a celulelor tumorale, sunt cele mai puține în toate cele 26 de cazuri studiate. La > 50% dintre pacienți raportul limfocite proxim tumorale / limfocite stromale este < 1:20. Concluzionăm că este puțin probabil ca triggerul limfocitelor intratumorale să aibă origine în structura celulelor tumorale și mai probabil, triggerul este reprezentat de citokinele eliberate din fibroblastele și macrofagele asociate cancerului, rezultând o recrutare nespecifică a limfocitelor intratumorale.

În majoritatea cazurilor s-a evidențiat o relație proporțională între limfocitele peritumorale și reacția stromală, dar am identificat și cazuri la care limfocitele peritumorale erau abundente când reacția stromală era minimă, sugerând că triggerul pentru limfocitele peritumorale poate fi reprezentat de citokine difuzate din stroma tumorală dar și de citokine de la nivelul frontului tumoral invaziv unde celulele normale vin în contact cu celulele transformate neoplazic.

În stadiile avansate, III și IV, de adenocarcinom pulmonar, toate adenocarcinoamele pulmonare investigate în acest studiu au asociat prezența intratumorală de >200 limfocite CD3+ pe 10 câmpuri microscopice la obiectiv mare, comparativ cu stadiile I și II, unde o parte dintre adenocarcinoame au prezentat < 200 limfocite CD3+ pe 10 câmpuri microscopice la obiectiv mare. Prezența limfocitelor intratumorale în toate stadiile indică posibilitatea intervenției imunoterapeutice încă de la începutul bolii.

Contrar așteptărilor, limfocitele peritumorale și proxim tumorale se corelează negativ cu perioada de monitorizare. Când limfocitele peritumorale sau proxim-tumorale sunt abundente, perioada de monitorizare scade, sugerând un curs accelerat al bolii. Studiile pe care le-am consultat privind valoarea prognostică a limfocitelor intratumorale în adenocarcinomul pulmonar au dat rezultate contradictorii.

La 34% dintre pacienți am observat o anumită configurare a celulelor inflamatorii: asocierea între macrofage abundente, limfocite stromale frecvente și limfocite proxim

tumorale rare. Dintre celule inflamatorii prezente în adenocarcinomul pulmonar, cele mai numeroase posibile ținte ale agenților terapeutici imunomodulatori sunt macrofagele și limfocitele.

Absența agregatelor limfocitare proxim tumorale sugerează absența expansiunii clonale a limfocitelor T citotoxice, fără a exclude însă posibilitatea existenței unui număr redus de limfocite T cu activitate antitumorală. Limfocitele CD8+ sunt între 5%-10% din totalul limfocitelor intratumorale și peritumorale și indică imunogenitate slabă a celulelor neoplazice în adenocarcinoamele studiate.

Prezența numeroaselor tipuri de celule inflamatorii intratumorale argumentează pentru o reacție imunitară locală nespecifică și polispecifică în boala neoplazică, dar ineficientă din cauza multiplelor citokine din micromediul tumoral care induc toleranța sistemului imunitar față de celulele neoplazice.

Bibliografie selectivă

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):505-527. doi:10.1001/jamaoncol.2015.0735.
2. Erika L. Abel and John DiGiovanni, Chapter 7 - Environmental Carcinogenesis, In *The Molecular Basis of Cancer (Third Edition)*, W.B. Saunders, Philadelphia, 2008, Pages 91-113, ISBN 9781416037033, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-141603703-3.10007-X>.
3. WD Travis, E Brambilla, AP Burke et al., *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, International Agency for Research on Cancer, Lyon (2015)
4. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2005;18(1):21-25.
5. G.V. Childs, *History of Immunohistochemistry, Pathobiology of Human Disease*, edited by Linda M. McManus and Richard N. Mitchell, Academic Press, San Diego, 2014, Pages 3775-3796, ISBN 9780123864574, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07401-3>.
6. Edelman GM, Poulik MD. Studies on structural units of the g-globulins. *J Exp Med.* 1961;113:861-84.
7. Mihaescu Grigore. *Imunologie si Imunochimie*, Ed. Universității din București, 2001.
8. P. E. Postmus, K. M. Kerr, et al., on behalf of the ESMO Guidelines Committee; Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice

Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, Volume 28, Issue suppl_4, 1 July 2017, Pages iv1–iv21, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222>

9. NCCN Guidelines Version 3.2019 Non-small cell cancer, National Comprehensive Cancer Network, USA https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site

10. Grivennikov, SI and Karin, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 20: 65–71

11. Diakos, Connie I et al., Cancer-related inflammation and treatment effectiveness, *The Lancet Oncology* , Volume 15 , Issue 11 , e493 - e503

12. Sahin U, Türeci Ö, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schober I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11810–11813.

13. Chen YT, Scanlan MJ et al., A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1914–1918.

14. RO Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69 (1992), pp. 11-25

15. R Kalluri, M Zeisberg, Fibroblasts in cancer, *Nat Rev Cancer*, 6 (2006), pp. 392-401

16. S.Y. Proskuryakov, V.L. Gabai, Mechanisms of tumor cell necrosis, *Curr. Pharm. Des.*, 16 (2010), pp. 56-68

17. C.H. Richards, et al., The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review

18. Zhuo Li et al., The intratumoral distribution influences the prognostic impact of CD68- and CD204-positive macrophages in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, Volume 123, 2018, Pages 127-135, ISSN 0169-5002, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.015>.

19. M. Becker, C.B. Muller, M.A. De Bastiani, et al. The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer *Histol. Histopathol.*, 29 (2014), pp. 21-31

20. F. Dai, L. Liu, G. Che, et al., The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*, 10 (2010), p. 220

21. Robert S. Kerbel; Tumor angiogenesis: past, present and the near future, *Carcinogenesis*, Volume 21, Issue 3, 1 March 2000, Pages 505–515, <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.505>

22. Jorge Barbazán, Danijela Matic Vignjevic, Cancer associated fibroblasts: is the force the path to the dark side?, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 56, 2019, Pages 71-79, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.002>.
23. P. Leone et al., MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 105 (2013), pp. 1172-1187
24. Katakai A, Scheid P, Piet M, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med* 2002;140: 320 –328.
25. Shweta Arora et al., Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases, *Immunobiology*, Volume 223, Issues 4–5, 2018, Pages 383-396, ISSN 0171-2985, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001>.
26. Shiyao Wang et al., Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer, *Cancer Letters*, Volume 452, 2019, Pages 14-22, ISSN 0304-3835, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.015>.
27. H. Choi et al., Transcriptome analysis of individual stromal cell populations identifies stroma-tumor crosstalk in mouse lung cancer model, *Cell Rep.*, 10 (2015), pp. 1187-1201
28. Martijn J. Schuijs, Hamida Hammad, Bart N. Lambrecht, Professional and ‘Amateur’ Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity, *Trends in Immunology*, Volume 40, Issue 1, 2019, Pages 22-34, ISSN 1471-4906, <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.001>.
29. Soo-Jung Um et al. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, Volume 70, Issue 2, 2010, Pages 188-194, ISSN 0169-5002, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.02.006>.
30. R.S. Fishel et al., Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies
Ann Surg, 206 (1) (1987), pp. 25-29
31. Laura Boldrini et al., Interleukin-8 in non-small cell lung carcinoma: Relation with angiogenic pattern and p53 alterations, *Lung Cancer*, Volume 50, Issue 3, 2005, Pages 309-317, ISSN 0169-5002, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.07.002>.
32. Wei Liu et al., CCR4 mediated chemotaxis of regulatory T cells suppress the activation of T cells and NK cells via TGF- β pathway in human non-small cell lung cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 488, Issue 1, 2017, Pages 196-203, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.034>.

33. Gurkan Mollaoglu et al., The Lineage-Defining Transcription Factors SOX2 and NKX2-1 Determine Lung Cancer Cell Fate and Shape the Tumor Immune Microenvironment, *Immunity*, Volume 49, Issue 4, 2018, Pages 764-779.e9, ISSN 1074-7613, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.020>.
34. Thomas, L., 1959, Reactions to homologous tissue antigens, in: *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States* (H. S. Lawrence, ed.), p. 529, Cassell, London.
35. Burnet, F. M., 1971, Immunological surveillance in neoplasia, *Transplant. Rev.* 7:3.
36. Naofumi Miyahara, Kazuhito Nii et al., Solid predominant subtype in lung adenocarcinoma is related to poor prognosis after surgical resection: A systematic review and meta-analysis, *European Journal of Surgical Oncology*, 2019, ISSN 0748-7983, <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.01.220>.
37. Tianxiang Chen, Jizhuang Luo et al., Impact of Solid Minor Histologic Subtype in Postsurgical Prognosis of Stage I Lung Adenocarcinoma, *The Annals of Thoracic Surgery*, Volume 105, Issue 1, 2018, Pages 302-308, ISSN 0003-4975, <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.08.018>.
38. Cristina Alguacil-Núñez et al., Current perspectives on the crosstalk between lung cancer stem cells and cancer-associated fibroblasts, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 125, 2018, Pages 102-110, ISSN 1040-8428, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.02.015>.
39. Fotis Perlikos, Kevin J. Harrington, Konstantinos N. Syrigos, Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: A comprehensive review, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 87, Issue 1, 2013, Pages 1-11, ISSN 1040-8428, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.007>.
40. T.K. Lee, et al., Morphometric and morphologic evaluations in stage III non-small cell lung cancers, prognostic significance of quantitative assessment of infiltrating lymphoid cells, *Cancer*, 63 (2) (1989), pp. 309-316
41. Signe Holm Nielsen et al., Serological Assessment of Activated Fibroblasts by alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA): A Noninvasive Biomarker of Activated Fibroblasts in Lung Disorders, *Translational Oncology*, Volume 12, Issue 2, 2019, Pages 368-374, ISSN 1936-5233, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.004>.
42. Daniela S. Thommen, Ton N. Schumacher, T Cell Dysfunction in Cancer, *Cancer Cell*, Volume 33, Issue 4, 2018, Pages 547-562, ISSN 1535-6108, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.012>.

43. M. Becker, C.B. Muller, M.A. De Bastiani, et al. The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer *Histol. Histopathol.*, 29 (2014), pp. 21-31
44. Flavia Radogna, Mario Dicato, Marc Diederich, Natural modulators of the hallmarks of immunogenic cell death, *Biochemical Pharmacology*, Volume 162, 2019, Pages 55-70, ISSN 0006-2952, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.12.016>.
45. Mariusz Kaczmarek et al., Concentrations of SP-A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non-small cell lung cancer, *Immunobiology*, Volume 223, Issue 2, 2018, Pages 200-209, ISSN 0171-2985, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.025>.
46. S. Gasser, et al., The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor, *Nature*, 436 (2005), pp. 1186-1190
47. K. Yoshiyama, Y. Terazaki, S. Matsueda, S. Shichijo, M. Noguchi, A. Yamada, T. Mine, T. Ioji, K. Itoh, K. Shirouzu, Personalized peptide vaccination in patients with refractory non-small cell lung cancer, *Int. J. Oncol.*, 40 (5) (2012), pp. 1492-1500
48. M.G. Krebs, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, 29 (12) (2011), pp. 1556-1563
49. Domenico Galati, Serena Zanotta, Empowering dendritic cell cancer vaccination: the role of combinatorial strategies, *Cytotherapy*, Volume 20, Issue 11, 2018, Pages 1309-1323, ISSN 1465-3249, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.09.007>.
50. E. Brambilla, et al., Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, 34 (2016), pp. 1223-1230