

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

TEZĂ DE DOCTORAT

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

**Student-doctorand:
EVSEI ANCA**

ANUL 2021

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

***NOI STRATEGII ȘI CLASIFICĂRI MOLECULARE ÎN
CARCINOAMELE ENDOMETRIALE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

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

**Student-doctorand:
EVSEI ANCA**

ANUL 2021

CUPRINS

Listă cu abrevieri.....	3
Listă cu lucrări științifice publicate.....	5
Introducere.....	6
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
1. Epidemiologia și factorii de risc și protectori în carcinoamele endometriale.....	12
1.1. Epidemiologia în carcinoamele endometriale.....	12
1.2. Factori de risc și protectori în carcinoamele endometriale.....	13
2. Clasificarea histopatologică și patogenza carcinoamelor endometriale.....	21
2.1. Carcinomul endometrial endometrioid.....	22
2.2. Carcinomul endometrial seros high-grade.....	29
2.3. Carcinomul cu celule clare.....	31
2.4. Carcinosarcomul.....	32
3. Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale.....	35
3.1. Carcinoame endometriale cu instabilitate microsatelitară - MMR-D/MSI.....	40
3.2. Carcinoame endometriale cu mutație la nivelul genei POLE.....	41
3.3. Carcinoame endometriale și mutația TP53.....	42
3.4. Carcinoame endometriale cu două/mai multe caracteristici moleculare.....	43
3.5. Interacțiunea genotip-fenotip.....	44
3.6. Subtipuri histopatologice rare și heterogenitatea tumorală.....	45
4. Evaluarea micromediului tumoral în subgrupurile moleculare ale carcinoamelor endometriale.....	46
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	50
5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	51

6. Metodologia generală a cercetării.....	52
6.1. Materialul studiat.....	52
6.2. Metode utilizate în cercetare.....	53
7. Rezultate.....	64
7.1. Analiza descriptivă demografică și supraviețuirea generală a carcinoamelor endometriale.....	64
7.2. Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale – studiu descriptiv și corelații statistice.....	88
7.3. Evaluarea micromediului tumoral în carcinoamele endometriale.....	106
7.4. Expresia PD-L1 în carcinoamele endometriale.....	117
Discuții.....	124
Concluzii.....	140
Contribuții proprii.....	152
Bibliografie.....	155
Anexe.....	182

Listă cu abrevieri

ARID1A – AT-Rich Interaction Domain 1A

CD4 – Cluster Of Differentiation 4

CD56 – Cluster Of Differentiation 56

CD68 – Cluster Of Differentiation 68

CD8 – Cluster Of Differentiation 8

CNH – Copy Number High

CNL – Copy Number Low

CSF-1 – Colony Stimulating Factor-1

ER – Estrogen Receptor

ESMO – European Society For Medical Oncology

FIGO – International Federation Of Gynecology

HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HNF-1 β – Hepatocyte Nuclear Factor – 1 B

IARC – International Agency For Research On Cancer

IMC – Indice De Masă Corporală

IOM – Institute Of Medicine

MELF – Microcystic, Elongated And Fragmented

MMR-D – Mismatch Repair Protein Deficiency

MSH6 – Muts Homolog 6

MSI – Microsatellite Instability

MSS – Microsatellite Stability

NK – Natural Killer

P53abn - Abnormal Expression Of P53

P53wt – Wild Type Expression Of P53

PARP – Poly (ADP-Ribose) Polymerase

PD-L1 – Programmed Death-Ligand 1

PMS2 – PMS1 Homolog 2

POLE – Polymerase E

PR – Progesterone Receptor

ProMise - Proactive Molecular Risk Classifier For Endometrial Cancer

PTEN – Phosphatase And Tensin Homolog

TAM – Tumor Associated Macrophages

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TILs – Tumor Infiltrating Lymphocytes

Problema fundamentală

Carcinomul endometrial constituie aproximativ 80% din cancerele corpului uterin în Europa, aflându-se pe un trend ascendent anual al incidenței și ratei de mortalitate. Acesta ocupă poziția șase în clasamentul celor mai frecvente cancere diagnosticate și a doua poziție în clasamentul celor mai frecvente cancere genitale feminine [1]. Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale a devenit o prioritate în sfera ginecologiei oncologice în ultimii ani, deoarece oferă informații prețioase despre comportamentul bolii, cu efect direct pe managementul terapeutic.

În 2013, TCGA a publicat o analiză genomică comprehensivă a carcinomului endometrial, stratificându-l în patru mari grupuri prognostice cu comportamente și terapii oncologice diferite. De altfel, în ultimii ani, s-a pus accent pe dezvoltarea și aprofundarea acestei clasificări în numeroase studii și proiecte de cercetare internaționale. Efortul susținut al comunității științifice în această direcție a determinat introducerea clasificării moleculare a carcinomului endometrial în ediția nouă, *WHO Female Genital Tumors*, a 5-a ediție, 2020, devenind în acest fel ”*standard of care*”. În același timp, aceeași comunitate a furnizat o schemă de clasificare surogat, facilă, disponibilă și parțial accesibilă pentru orice laborator, care emulează cele mari patru subgrupuri moleculare descrise de TCGA.

Efectul direct al acestor demersuri științifice a facilitat aprofundarea biologiei tumorale ale acestor carcinoame, determinând în acest fel generarea unor protocoale terapeutice țintite pe fiecare grup prognostic. Una din consecințele directe a fost aprobarea imunoterapiei, în special a inhibitorilor de PD-L1, pentru carcinomul endometrial recurent și metastatic, cu rezultate promițătoare [2].

Motivația temei de cercetare elaborată în actuala teză de doctorat este reprezentată de paucitatea studiilor și cercetărilor științifice țintite asupra profilului molecular și comportamentului biologic al acestei neoplazii la pacientele din România.

Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Prezentul studiu doctoral își propune evaluarea subgrupurilor moleculare ale carcinoamelor endometriale în rândul populației feminine din România, cu scopul de a stratifica din punct de vedere biologic acest tip de carcinom. De asemenea, mi-am propus evaluarea micromediului tumoral și expresiei PD-L1 la nivelul acestor carcinoame pentru a identifica mecanismele complexe care se desfășoară la nivel molecular și imun, informații care generează un substrat pentru eventuale ținte terapeutice.

Cohorta studiată a fost analizată retrospectiv pe o perioadă de timp de 5 ani (2014-2019) și a fost alcătuită dintr-un număr de 50 de cazuri de carcinoame endometriale. Am urmărit analiza unor parametri demografici, clinico-patologici și imunohistochimici pentru acest tip de carcinom. În consecință, obiectivele urmărite au fost următoarele:

- Perfecționarea caracteristicilor clinico-demografice, histopatologice și imunohistochimice ale carcinoamelor endometriale raportată la varii factori fenotipici în vederea aprofundării tabloului biologic al carcinoamelor endometriale.
- Stabilirea unei baze de date cu înscrierea acestor parametri histopatologici incluși în studiu.
- Identificarea și definirea parametrilor histopatologici ce caracterizează acest tip de carcinom endometrial și evidențierea corelațiilor cu datelor imunohistochimice cu scopul de a stabili premisele pentru evaluarea clasificării moleculare a carcinoamelor endometriale.
- Sublinierea mecanismelor moleculare implicate în clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale și a micromediului tumoral pentru a evidenția posibilele ținte terapeutice pentru acest tip de cancer.

Metodele utilizate pentru acest studiu sunt reprezentate de :

- ✓ Analiza parametrilor clinico-demografici pentru cazurile selecționate: vârstă, categorie de vârstă, anul diagnosticului, anul decesului (unde a fost cazul), supraviețuirea generală (luni).
- ✓ Analiza parametrilor histopatologici pentru determinarea subtipului histopatologic, gradului de diferențiere, patternului de invazie tumorală, gradului de invazie miometrială, necrozei tumorale, invaziei limfo-vasculare, prezenței piesei de

omentectomie, prezenței citologiei peritoneale, prezenței citologiei cervico-vaginale, dimensiunii tumorale, leziunilor preneoplazice, adenomiozei uterine, infiltratului inflamator limfocitar intratumoral, invaziei miometriale, stadializării pTNM, stadializării FIGO, criteriilor ESMO etc.

- ✓ Analiza imunohistochimică a diverșilor parametri imunohistochimici de predicție și prognostic și adăugarea altor factori imunohistochimici pentru evidențierea rolului de prognostic în cercetare al acestora.
- ✓ Analiza statistică a urmărit stabilirea corelațiilor semnificative între parametrii clinico-epidemiologici, histopatologici și imunohistochimici.

Metodologia de cercetare

Cohorta studiată a fost utilizată într-un studiu retrospectiv, analitic, în cadrul căruia am urmărit o serie de factori clinico-epidemiologici, histopatologici și imunohistochimici. Am selectat pentru lotul de studiu 50 de carcinoame endometriale, într-o perioadă de timp de 4 ani (2014-2019). Cazuistica a fost selectată din cadrul departamentelor de Ginecologie și Chirurgie Generală din Spitalul Universitar de Urgență București, respectiv din cadrul departamentelor Chirurgie Generală I și II din Spitalul Clinic "Sfânta Maria".

Departamentele de Anatomie Patologică din ambele instituții au furnizat registrele și bazele de date de pacienți, din care am selecționat date clinice, demografice relevante și factorii histopatologici ai carcinoamelor endometriale analizate. Lotul studiat a fost selectat numai din categoria pacienților care au suferit intervenție de histerectomie totală cu anexectomie bilaterală, cu sau fără evidare limfoganglionară și cu/fără omentectomie.

Următorul pas a constat în selectarea și revizualizarea lamelor histologice și selectarea blocurilor de parafină reprezentative, aflate în histotecile și blocotecile laboratoarelor de Anatomie Patologică din aceleași instituții menționate. Ulterior, toate cele 50 de cazuri au fost supuse examenului imunohistochimic în cadrul Laboratorului Central Regina Maria, București.

Pentru fiecare caz în parte s-a întocmit o fișă de urmărire. Datele obținute au fost stocate electronic și apoi prelucrate prin programe statistice cu scopul identificării factorilor prognostici nefavorabili în carcinoamele endometriale. Astfel, **studiul I** a urmărit **parametri clinico-epidemiologici** cum ar fi:

- Nume și prenume pacient

- Cod numeric personal pacient
- Vârsta pacient
- Tratamentul oncologic efectuat (chimioterapie și/sau radioterapie), unde a fost cazul
- Anul intervenției chirurgicale
- An deces, unde a fost cazul.

Studiul histopatologic al carcinoamelor endometriale a urmărit identificarea principalilor parametri microscopici tumorali cu reevaluarea tuturor lamelor de hematoxilină-eozină:

- Evaluarea piesei de omentectomie – absentă/prezentă non-tumorală/prezentă tumorală [3–5]
- Evaluarea citologiei peritoneale – absentă/prezentă non-tumorală/prezentă tumorală [6, 7]
- Evaluarea citologie cervico-vaginale – reactivă/tumorală/absentă [8, 9]
- Dimensiunea tumorală: <2 cm/≥2 cm [10]
- Leziuni preneoplazice: absent/hiperplazie endometrială fără atipii/hiperplazie endometrială cu atipii - neoplazie intraepitelială endometrială [11]
- Subtipul histopatologic: endometrioid/seros/cu celule clare/mixt/carcinosarcom [12]
- Invazia limfo-vasculară: prezentă/absentă [13]
- Adenomioza uterină: prezentă/absentă [14]
- Necroza tumorală: prezentă/absentă [15]
- Infiltratul inflamator limfocitar intra-tumoral (TILs) : minim/moderat/marcat [16]
- Invazia miometrială: <50%/≥50% [17, 18]
- Pattern de invazie tumorală: pushing/infiltrativ difuz/cu afectarea adenomiozei/MELF [19, 20]
- Grad de diferențiere tumoral FIGO: [12, 21]
- Stadializarea tumorală pTNM: [12]
- Stadiul FIGO [12].

Studiul II a urmărit testarea imunohistochimică (Tabel 6.1) a factorilor de prognostic ER, PR și HER2 și a markerilor imunohistochimici PMS2, MSH6 și p53. Următoare etapă a

constat în formularea subgrupurilor moleculare de carcinom endometrial în funcție de expresia MSH6, PMS2 și p53, astfel:

- MSS – subgrup molecular cu stabilitate microsatelitară – MSH6 pozitiv, PMS2 pozitiv [22].
- MSI/MMRd – subgrup molecular cu instabilitate microsatelitară – MSH6 negativ și PMS2 negativ/MSH6 pozitiv și PMS2 negativ/MSH6 negativ și PMS2 pozitiv [22].
- P53wt (wild-type) – expresie normală nucleară: amestec de celule tumorale negative, slab pozitive și puternic pozitive [23].
- P53 abn (abnormal) – expresie anormală: supraexpresie nucleară puternică, difuză în peste 90% din celule tumorale / absența completă a expresiei nucleare pentru acest marker [23].

Tabel 6.1. Panel de markeri imunohistochimici utilizați

<i>Anticorp</i>	<i>Număr catalog</i>	<i>Clonă/Producător</i>	<i>Reacție</i>	<i>Sursă</i>
ER	790-4325	SP1/Roche	Nucleară	Iepure
PR	790-4296	1E2/Roche	Nucleară	Iepure
HER2	790-2991	4B5/Roche	Membrana	Iepure
MSH6	790-5092	SP93/Roche	Nucleară	Iepure
PMS2	790-5094	A16-4/Roche	Nucleară	Șoarece
P53	760-2542	Bp-53-11/Roche	Nucleară	Șoarece
CD4	790-4423	SP35/Roche	Membrana	Iepure
CD8	790-4460	SP57/Roche	Membrana	Iepure
CD56	790-4465	123C3/Roche	Membrana, Citoplasmatică	Șoarece
CD68	790-2931	KP-1/Roche	Citoplasmatică, Membrana	Șoarece
PD-L1	790-4905	SP263/Roche	Membrana și/sau Citoplasmatică	Iepure

Studiul III a urmărit testarea imunohistochimică a micromediului tumoral urmărind markerii imunohistochimici : CD4 – marker pentru limfocite Thelper, CD8 – marker pentru limfocite T citotoxice, CD56 – marker pentru celule NK și CD68 – marker pentru macrofage.

În **studiul IV** am testat pozitivitatea celulelor tumorale pentru PD-L1, important marker imunohistochimic în elaborarea tratamentelor imunoterapice țintite [24].

Prelucrarea statistică.

Cohorta de 50 de pacienți este analizată statistic în programul SPSS IBM versiunea 21. S-a efectuat analiză descriptivă pentru a identifica particularitățile și distribuția parametrilor demografici, clinici și paraclinici ai grupului. De asemenea, s-au efectuat asocieri statistice între parametrii clinici și demografici utilizând testul Chi-square.

S-au testat asocieri între parametrii prognostici ai cohorței (ex: vârsta, stadiul, invazia limfo-vasculară etc.) și subgrupurile moleculare ale carcinoamelor endometriale obținute în urma testării imunohistochimice: MSS, MSI/MMR-d, p53abn, p53wt. Pentru variabilele categoricale și binare s-a utilizat Chi-square test. Pentru a testa asocierile între variabilele numerice și cele categorice s-a utilizat Independent Sample T-test (între vârstă și MSS, MSI/MMR-d, p53 abn, p53 wt). Pentru evaluarea variabilelor binare s-a utilizat testul Sample Proportion. Curba de supraviețuire Kaplan-Meier a fost efectuată pentru fiecare parametru în relație cu subgrupurile moleculare MSS, MSI/MMR-D, p53abn, p53wt.

Pentru a studia relația dintre PD-L1 și markerii CD 4, CD8, CD56 și CD68 s-a utilizat testul non-parametric Kruskal-Wallis. S-a utilizat funcția Explore pentru analiza descriptivă. Pentru analiza bivariată a variabilele nominale cu peste 3 subgrupuri și variabilele numerice s-a utilizat testul non-parametric Kruskal-Wallis, pentru variabilele cu 3 subgrupuri s-a utilizat testul One-Way ANOVA, pentru variabilele cu 2 subgrupuri care nu întrunesc condițiile pentru testul parametric Independent t-test, s-a utilizat Mann Whitney U-test.

Sinteza studiilor

Capitolul 7.1. Analiza descriptivă demografică și supraviețuirea generală a carcinoamelor endometriale (Studiul I)

Studiul I s-a bazat pe o extinsă analiză descriptivă a cazuisticii selectate cu accentuarea corelațiilor semnificative statistic între diverși parametri clinico-histopatologici și supraviețuirea generală. O parte din rezultatele finale ale acestei cercetări doctorale pot fi sintetizate astfel: vârsta medie la diagnostic a fost de 62.82 ani cu categoria de vârstă de 61-70 de ani fiind cea mai frecventă; supraviețuirea generală a fost de 84%; carcinomul endometrioid a fost cel mai frecvent (82%) din cazuri; dimensiunea tumorală >2 cm a fost remarcată în 66% din cazuri; gradul FIGO 2 a fost întâlnit cel mai des (42%), urmat de gradul FIGO 3 (40%); pT1b a fost identificat ca fiind cel mai frecvent (26%); invazia limfo-vasculară a fost observată în 78% din cazuri, adenomioza uterina în 16 cazuri, necroza tumorală în 37 de cazuri, categoria ESMO de *HighIntermediateRisk* în 30% din cazuri etc.

Dintre asocierile semnificative statistic, se poate remarca conexiunea dintre omentectomia chirurgicală și dimensiunea tumorală ($p=0.046$), patternul de invazie tumorală ($p=0.042$), criteriile de stratificare ale riscului ESMO ($p=0.039$) (Fig. 7.24) și cu stadiile FIGO ($p=0.018$). Categoriile de vârstă s-au asociat cu leziunile preneoplazice ($p=0.01$), cu adenomioza uterină ($p=0.038$) și cu patternul de invazie tumorală ($p=0.042$). Citologia peritoneală a fost asociată statistic cu dimensiunea tumorală ($p=0.025$), în timp ce citologia cervico-vaginală cu stadiul FIGO ($p=0.0001$). TILs minim a fost observat în carcinoamele seroase și cele cu celule clare, iar TILs moderat a fost observat în subtipul histopatologic endometrioid ($p=0.026$). Supraviețuirea generală a prezentat un grad de asociere ridicat cu omentectomia ($p=0.044$), cu subtipul histopatologic ($p=0.002$) (Fig. 7.33), cu invazia miometrială ($p=0.0001$), cu expresia ER ($p=0.006$) și cu expresia PR ($p=0.011$).

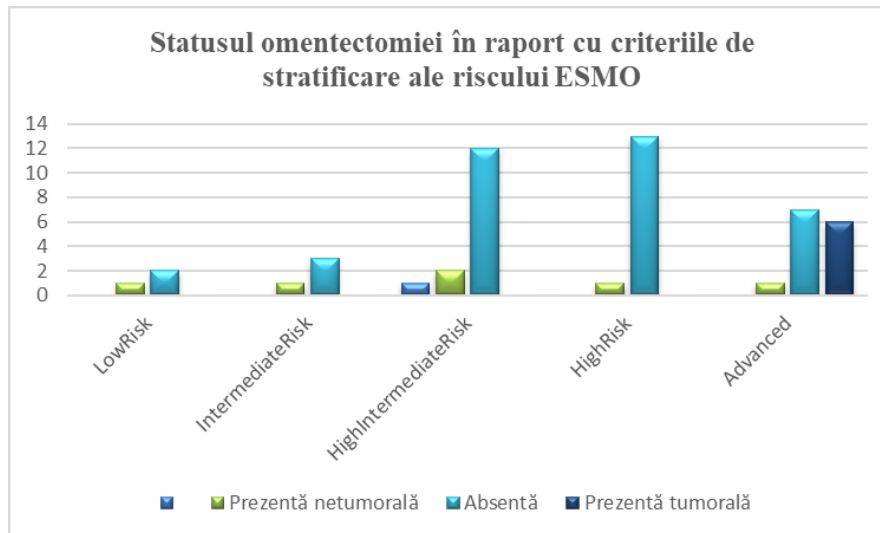


Fig. 7.24. Statusul omentectomiei în raport cu criteriile de stratificare ale riscului ESMO

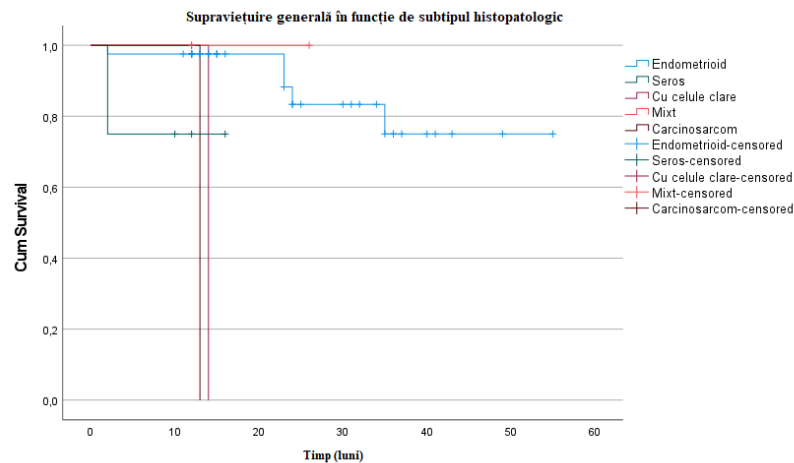


Fig. 7.32. Supraviețuire generală în funcție de subtipul histopatologic

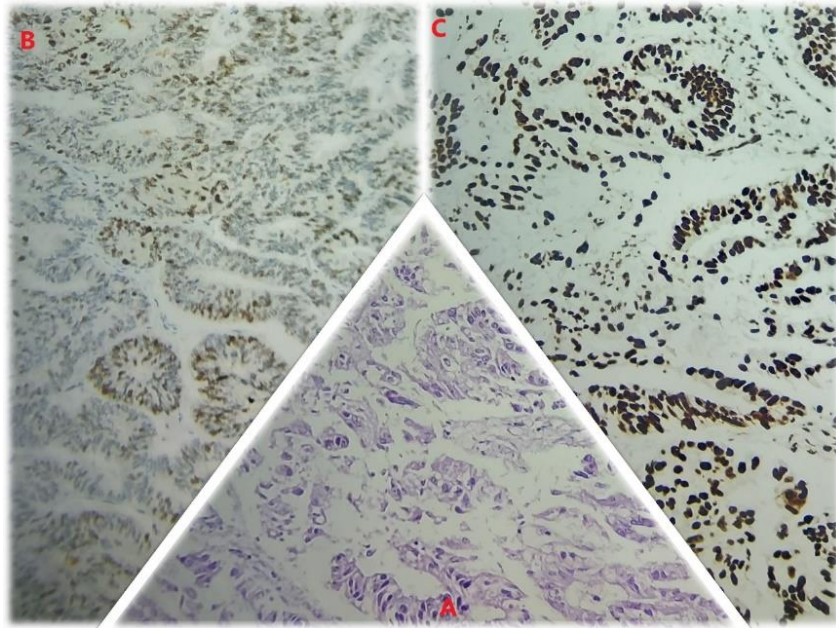
Capitolul 7.2. Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale – studiu descriptiv și corelații statistice (Studiul II)

Studiul II a urmărit distribuția subgrupurilor moleculare în cazuistica aleasă și corelațiile semnificative statistic între acestea și parametrii clinico-histopatologici. Distribuția procentuală a subgrupului molecular MSI în lotul studiat de 50 de carcinoame endometriale a fost de 68%, în timp ce subgrupul molecular MSS (Fig. 7.37) a prezentat un procent de 32% de cazuri. Analiza descriptivă a parametrilor clinico-demografici și histopatologici în subgrupurile moleculare MSI și MSS a relevat următoarele asocieri: la nivelul categoriei de vârstă, s-a observat că vârsta medie în categoria MSS este de 64 de ani, surclasând astfel categoria MSI în care vârsta medie este de 59 ani. Subgrupul molecular MSS a prezentat cazurile cu

omentectomie tumorală, cu citologie peritoneală pozitivă și cu citologie cervico-vaginală pozitivă. De asemenea, același subgrup a prezentat cel mai mare procent de carcinoame endometrioide și de carcinoame seroase versus subgrupul molecular MSI. Categoriile de risc ESMO au fost evidențiate de categoria *High* în subgrupul molecular MSS și de *HighIntermediate* în subgrupul MSI.

Distribuția procentuală a subgrupului molecular p53abn în lotul studiat de 50 de carcinoame endometriale a fost de 26%, în timp ce subgrupul molecular p53wt a prezentat un procent de 74% de cazuri. Vârsta mediană la momentul diagnosticului în subcategoria p53abn a fost mai mare (65 ani) decât vârsta mediană observată în subcategoria p53wt (63 ani). Omentul transformat tumoral a fost identificat în proporții egale în ambele categorii (50%), iar omentul prezent non-tumoral a fost observat în 83.3% din cazurile subcategoriei p53wt. 85.4% de carcinoame endometriale endometrioide aparțin subgrupului molecular p53wt, în timp ce subgrupul molecular p53abn conține 9 cazuri de carcinoame endometrioide. TILs a fost minim și moderat în 13 cazuri p53abn, iar criteriile de stratificare ale riscului ESMO au relevat stadiul *High Intermediate* și *High* ca fiind cel mai frecvent în cazurile p53wt și stadiul *Advanced* în cazurile p53 abn.

Asocierile semnificativ statistice au revelat corelații între expresia MSI și dimensiunea tumorală peste 2 cm ($p=0.028$), între subgrupul molecular p53wt și subtipul histopatologic ($p=0.006$), respectiv pT ($p=0.033$). De asemenea, s-a observat asociere semnificativ statistică între TILs și subgrupul molecular p53abn ($p=0.016$), și între criteriile de stratificare ale riscului ESMO și subgrupul molecular p53wt ($p=0.022$). În același timp, s-au observat corelații între expresia ER și subgrupul molecular p53wt ($p=0.001$). Cohorta noastră de 50 de pacienți a prezentat carcinoame endometriale care au aparținut de două subgrupuri moleculare, fără a prezenta însă semnificație statistică ($p=0.088$) astfel: 9 cazuri MSS/p53abn, 4 cazuri MSI/p53abn, 25 de cazuri MSS/p53wt și 12 cazuri MSI/p53wt (Fig. 7.51 - continuare).



**Fig. 7.37. Carcinom endometrial endometrioid, subgrup molecular MSS (200x): A. HE
B. MSH6 pozitiv C. PMS2 pozitiv**

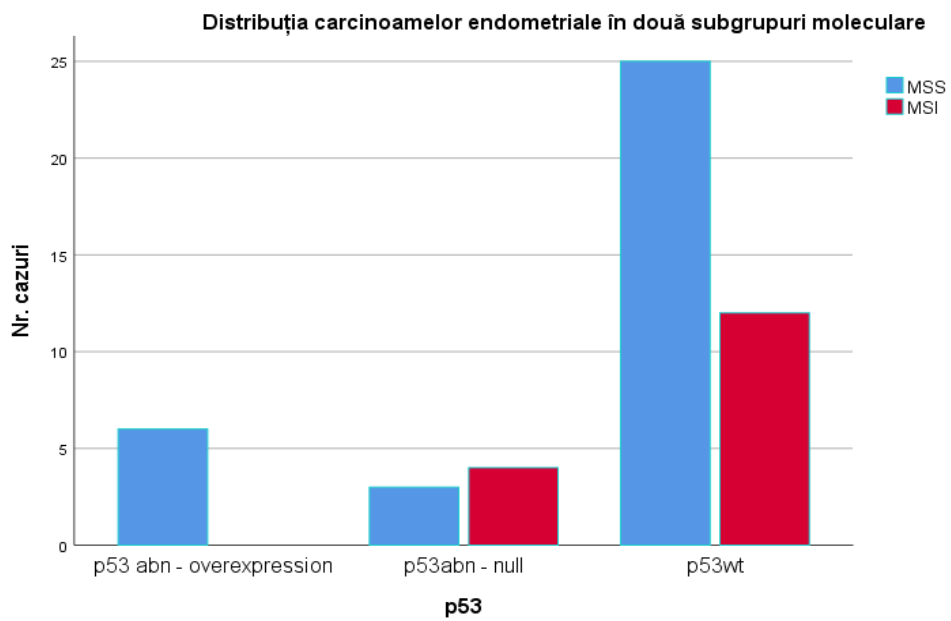


Fig. 7.51. (continuare) Distribuția carcinoamelor endometriale în două subgrupuri moleculare.

**Capitolul 7.3. Evaluarea micromediului tumoral în carcinoamele endometriale
(Studiul III)**

Studiul III a relevat următoarele rezultate: la nivelul micromediului tumoral, limfocitele CD4+ s-au corelat statistic cu TILs (p=0.046), cu expresia ER (p=0.049), cu invazia miometrială (p=0.042). Limfocitele CD8+ s-au corelat semnificativ statistic cu TILs (p=0.04) și cu invazia miometrială. Celulele NK CD56+ s-au asociat cu expresia PR (p=0.004), iar macrofagele CD 68+ s-au corelat statistic cu TILs (p=0.025).

Distribuția limfocitelor CD4+, limfocitelor CD8+ și a macrofagelor CD68+ s-a corelat statistic cu subgrupul molecular MSI/MMR-D (Tabel 7.5.). Subgrupul molecular p53wt a fost asociat semnificativ statistic cu distribuția limfocitelor CD4+ stromale (p=0.044).

Tabel. 7.5. Distribuția celulelor imune din micromediul tumoral în subgrupurile moleculare MMR-D versus MSS

	Statistică descriptivă		Media valorii CD		Indicatori statistici		
	(N)		(medie)		t	df	p value
	MMR-D	MSS	MMR-D	MSS			
CD 4 stromal	16	34	41.69	24.15	2.875	48	0.006
CD4 intratumoral	16	34	9.25	6.32	1.414	48	0.164
CD 8 stromal	16	34	33.13	16.06	3.121	48	0.003
CD8 intratumoral	16	34	19.94	7.65	2.512	48	0.015
CD 56 stromal	16	34	5.13	3.82	0.866	48	0.391
CD56 intratumoral	16	34	1.38	1.88	-0.990	48	0.327
CD 68 stromal	16	34	30.75	19.91	2.746	48	0.008
CD68 intratumoral	16	34	8.88	7.94	0.674	48	0.503

Capitolul 7.4. Expresia PD-L1 în carcinoamele endometriale (Studiul IV)

În **studiul IV** expresia PD-L1 efectuată pe cele 50 de cazuri de carcinoame endometriale a avut următoarele rezultate: 60% din cazuri au prezentat expresie PD-L1 <1%, 34% din cazuri au prezentat 1-49% pozitivitate, iar 6% din cazuri au avut $\geq 50\%$ celule tumorale pozitive (Fig. 7.60).

PD-L1 s-a corelat semnificativ statistic cu categoria de vârstă ($p=0.005$), cu stadiul pT ($p=0.012$), cu invazia miometrială ($p=0.037$) și cu criteriile de stratificare ale riscului ESMO ($p=0.017$). De asemenea, relația dintre expresia PD-L1 și celulele imune din micromediul tumoral a evidențiat asocieri între PD-L1 și limfocitele CD4+ stromale ($p=0.005$) (Fig. 7.63), limfocitele CD8+ stromale ($p=0.000$) și intratumorale ($p=0.002$) și macrofagele CD68+ stromale ($p=0.004$). Dintre subgrupurile moleculare, s-a observat corelația între expresia PD-L1 și categoria MSI ($p=0.014$).

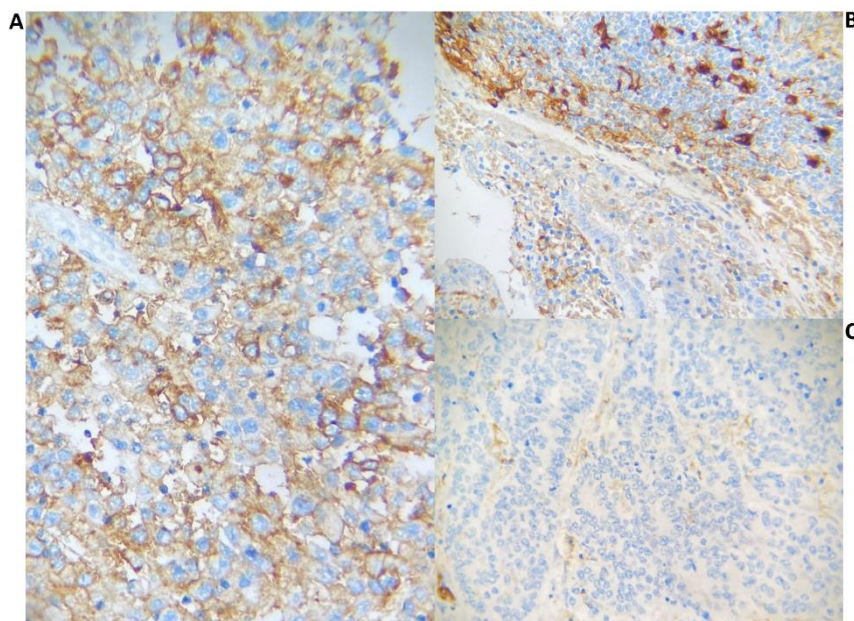


Fig. 7.60. Expresia PD-L1 în carcinoamele endometriale (x200): A. PD-L1 $\geq 50\%$ B: PD-L1 1-49%. C. PD-L1<1%.

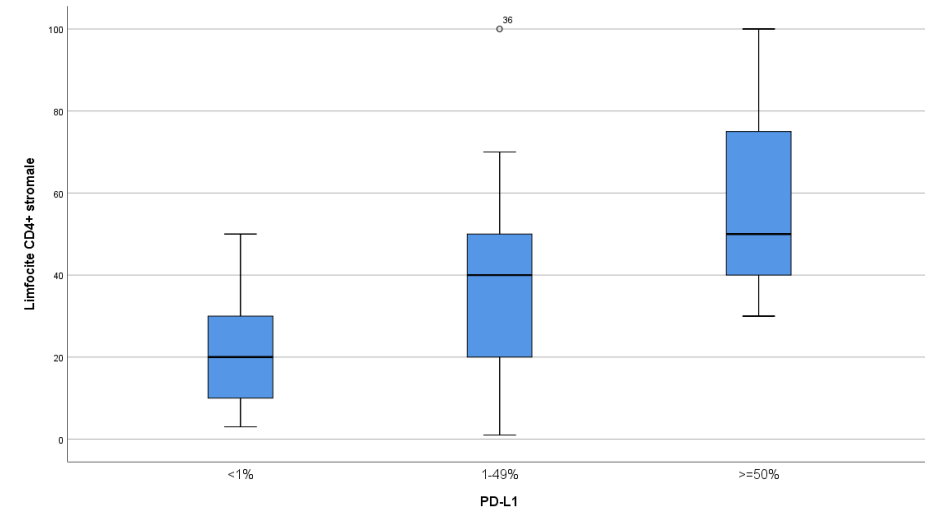


Fig. 7.63. Distribuția limfocitelor stromale CD4+ în subgrupurile PD-L1

Concluzii și contribuții proprii

Principalele contribuții personale, originale, selectate dintre cele prezentate anterior și descrise în amănunt în teza de doctorat, pot fi sintetizate astfel:

Analiza descriptivă demografică și supraviețuirea generală a carcinoamelor endometriale:

- * Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale este esențială și obligatorie întrucât stabilește subgrupuri moleculare cu comportament biologic și molecular diferit și prognostic specific.
- * Analiza parametrilor histopatologici a inclus evaluarea celor confirmați ca factori de prognostic: invazie limfo-vasculară, grad FIGO, stadializare pTNM, stadiu FIGO, invazie miometrială etc, dar a inclus și alții noi:
- * Analiza histopatologică a piesei de omentectomie chirurgicală, tumorală și non-tumorală a demonstrat asocieri semnificativ statistice cu diverși parametri histopatologici printre care și dimensiunea tumorală; astfel carcinoamele endometriale sub 2 cm au o predilecție în a determina metastaze carcinomatoase omentale mai frecvent decât cele cu dimensiune peste 2 cm.
- * Supraviețuirea generală prezintă un grad ridicat de asociere cu acest parametru histopatologic, atât pentru carcinoamele endometriale seroase cât și pentru cele endometrioid.

- * Citologia peritoneală pozitivă tumoral s-a asociat cu dimensiunea tumorală sub 2 cm, similar omentectomiei.
- * Citologia cervico-vaginală pozitivă tumoral a fost identificată în carcinoamele endometriale grad FIGO 1.
- * Subtipul histopatologic s-a asociat cu TILs moderat și marcat pentru carcinoamele endometrioide și cu TILs minim în carcinoamele non-endometrioide.
- * Adenomioza uterină a fost observată la categoria de vârstă 40-50 ani, paciente mai tinere decât categoria de vârstă obișnuită.
- * Criteriile de stratificare ale riscului ESMO s-au dovedit a fi utile în a încadra carcinoamele endometriale din punct de vedere al parametrilor histopatologici și s-au asociat statistic cu o parte din ei: necroza tumorală, patternul de invazie tumoral, invazia limfo-vasculară etc.
- * Statusul receptorilor hormonal ER și PR s-a corelat cu supraviețuirea generală.

Clasificarea moleculară a carcinoamelor endometriale:

- * Subgrupul molecular MSI a prezentat un procent de 68%, aproape triplu cât sunt raportate în literatură.
- * Subgrupul molecular MSS s-a asociat cu omentectomia tumorală în aproape toate subtipurile histopatologice.
- * Citologia peritoneală pozitivă tumoral a fost procentual mai frecventă în subgrupul MSS și poate fi utilă în viitor pentru evaluarea statusului MSI prechirurgical.
- * Subgrupul molecular MSS apare în carcinoamele endometriale high-grade în lotul nostru, spre deosebire de studiile din literatură.
- * Subgrupul molecular MSI s-a asociat cu stadii pT avansate, dar cu status limfoganglionar negativ.
- * Subgrupul molecular MSS a fost caracterizat de carcinoame endometriale ER și PR pozitive.
- * Distribuția procentuală a subgrupului molecular p53wt a fost mult mai mare decât în studiile din literatură, în timp ce distribuția procentuală pentru subgrupul p53 abn a fost similară.
- * Subgrupul molecular p53abn s-a corelat cu omentectomia tumorală și cu citologia peritoneală pozitivă.

- * Subtipul histopatologic endometrioid și seros a fost identificat în ambele subgrupuri, în timp ce carcinomul cu celule clare și carcinosarcomul au aparținut subgrupului molecular p53abn.
- * Adenomioza uterină, patternul de invazie tumoral *MELF* și subcategoriile TILs moderat și marcat au caracterizat aproape în exclusivitate subgrupul molecular p53wt.
- * Subgrupul molecular p53wt a fost identificat în stadii pT incipiente cel mai frecvent, dar stadiile pN și pM au fost mai avansate.
- * HER2 a fost pozitiv în subtipul molecular p53abn, subtipul histopatologic seros high-grade.
- * Din categoria carcinoamelor endometriale cu caracteristici moleculare multiple, s-a observat că grupul MSS/p53wt a fost cel mai frecvent.

Evaluarea micromediului tumoral și expresia PD-L1 în carcinoamele endometriale:

- * Limfocitele CD4+ și limfocitele CD8+ din micromediul tumoral au fost observate la carcinoamele endometriale cu invazie miometrială mai mică de 50%, spre deosebire de alte studii.
- * Celulele NK CD56+ au avut grad de asociere ridicat cu expresia PR.
- * Macrofagele CD68+ s-au asociat statistic cu stadii avansate de boală, ER pozitiv, TILs marcat și grad FIGO 3.
- * Subgrupul molecular MSI a prezentat densități mari de limfocite CD4+, limfocite CD8+ și macrofage CD68+.
- * Subgrupul p53wt a avut densități crescute de limfocite CD4+.
- * Procentul de carcinoame endometriale PD-L1 pozitive a fost net mai mare decât în datele raportate în literatură.
- * Expresia PD-L1 s-a corelat cu dimensiunea tumorală peste 2 cm, grad FIGO 3, ER pozitiv, TILs marcat și cu stadii pTNM incipiente.
- * Expresia PD-L1 s-a corelat statistic cu limfocitele CD4+, limfocitele CD8+ și macrofagele CD68+.
- * Expresia PD-L1 a fost identificat cu preponderență în subgrupul molecular MSI.
- * Deși carcinoamele endometriale PD-L1 pozitive sunt de obicei high-grade și/sau non-endometrioid, marea majoritatea fac parte din subgrupul molecular p53wt.

Direcțiile viitoare de cercetare implică extinderea bazei de date de paciente cu carcinoame endometriale, eventual din centre diferite, cu scopul de a alcătui profilul acestei neoplazii în populația feminină din România. În aceeași măsură, este esențială facilitarea accesului la testări genetice, în special pentru mutația genei POLE, atât pentru anatomopatolog și clinician, cât și pentru pacient.

Bibliografie selectivă

- [1] WHO classification of tumours editorial board. *Female genital tumours*. 2020.
- [2] Engerud H, Berg HF, Myrvold M, et al. High degree of heterogeneity of PD-L1 and PD-1 from primary to metastatic endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 2020; 157: 260–267.
- [3] Kaban A, Topuz S, Erdem B, et al. Is Omentectomy Necessary for Non-Endometrioid Endometrial Cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2018; 83: 482–486.
- [4] Chen M, Guo P, Tan J, et al. The role of omentectomy in the surgical treatment of uterine serous carcinoma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X* 2019; 4: 100084.
- [5] Bayrak M, Yılmaz A, Yılmaz F, et al. Omental Micrometastasis in Endometrial Cancer. *Oncol Res Treat* 2019; 42: 466–469.
- [6] Vizza E, Mancini E, Laquintana V, et al. The prognostic significance of positive peritoneal cytology in endometrial cancer and its correlations with L1-CAM biomarker. *Surgical Oncology* 2019; 28: 151–157.
- [7] Furukawa S, Iwase H, Endo S, et al. EP524 The significance of positive peritoneal cytology in G1/G2 endometrioid carcinoma of uterine body. In: *ePoster*. BMJ Publishing Group Ltd, p. A322.2-A322.
- [8] Dalal VK, Dave P, Patel SM, et al. Effectiveness of Pap Smears as Predictor in the Diagnosis of Carcinoma Endometrium at a Tertiary Oncology Centre in India. *Indian J Gynecol Oncolog* 2020; 18: 33.
- [9] Serdy K, Yildiz-Aktas I, Li Z, et al. The Value of Papanicolaou Tests in the Diagnosis of Endometrial Carcinoma: A Large Study Cohort From an Academic Medical Center. *Am J Clin Pathol* 2016; 145: 350–354.
- [10] Shah C, Johnson E, Everett E, et al. Does size matter? Tumor size and morphology as predictors of nodal status and recurrence in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 2005; 99: 564–570.
- [11] Martignetti JA, Pandya D, Nagarsheth N, et al. Detection of endometrial precancer by a targeted gynecologic cancer liquid biopsy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2018; 4: a003269.

- [12] College of American Pathologists, Protocol for the Examination of Specimens From Patients with Carcinoma and Carcinosarcoma of the Endometrium. Version: Endometrium 4.1.0.2, February, 2020.
- [13] Cusano E, Myers V, Samant R, et al. Prognostic Significance of Lymphovascular Space Invasion in the Absence of Lymph Node Metastases in Early-Stage Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2018; 28: 890.
- [14] Zouzoulas OD, Tsolakidis D, Efstratiou I, et al. Correlation between Adenomyosis and Endometrial cancer: 6-year experience of a single center. *Facts Views Vis Obgyn* 2018; 10: 147–152.
- [15] Bredholt G, Mannelqvist M, Stefansson IM, et al. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* 2015; 6: 39676–39691.
- [16] Grzankowski KS, Szender JB, Kanehira K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer with loss of expression in mismatch repair: A cohort study of patients with metachronous colorectal cancer. *Gynecologic Oncology* 2016; 141: 118.
- [17] Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa N, et al. Preoperative tumor size is associated with deep myometrial invasion and lymph node metastases and is a negative prognostic indicator for patients with endometrial carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9: 23164–23172.
- [18] van der Putten LJM, van de Vijver K, Bartosch C, et al. Reproducibility of measurement of myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Virchows Arch* 2017; 470: 63–68.
- [19] Cole AJ, Quick CM. Patterns of Myoinvasion in Endometrial Adenocarcinoma: Recognition and Implications. *Advances In Anatomic Pathology* 2013; 20: 141–147.
- [20] Prodromidou A, Vorgias G, Bakogiannis K, et al. MELF pattern of myometrial invasion and role in possible endometrial cancer diagnostic pathway: A systematic review of the literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2018; 230: 147–152.
- [21] Soslow RA, Tornos C, Park KJ, et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice. *International Journal of Gynecological Pathology* 2019; 38: S64–S74.

[22] Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Annals of Oncology* 2017; 28: 96–102.

[23] Köbel M, Ronnett BM, Singh N, et al. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *International Journal of Gynecological Pathology* 2019; 38: S123–S131.

[24] Ott PA, Bang Y-J, Berton-Rigaud D, et al. Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Advanced Programmed Death Ligand 1-Positive Endometrial Cancer: Results From the KEYNOTE-028 Study. *JCO* 2017; 35: 2535–2541.

Listă cu lucrări științifice publicate

Articole publicate în reviste științifice:

1. **Evsei, A.**, Birceanu-Corobea, A., Csonka, T., Copca, N. & Sajin, M. (2020). Molecular Subgroups of Endometrial Carcinoma in Romanian Patients. *Revista de Chimie*, 71(9), 268-276. <https://doi.org/10.37358/RC.20.9.8337>
 - <https://revistadechimie.ro/Articles.asp?ID=8337>
2. **Evsei, A.**, Birceanu-Corobea, A., Ghita, M., Copca, N. & Sajin, M. (2021). Tumour Microenvironment And PD-L1 Expression In Endometrial Carcinoma. *Archives of the Balkan Medical Union*, 56(1), 11-19. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.1.01>
 - <https://umbalk.org/tumour-microenvironment-and-pd-l1-expression-in-endometrial-carcinoma/>
3. **Evsei, A.**, Birceanu-Corobea, A., Ghita, M., Sajin, M. & Copca., N. (2021). Beta-Catenin – An Important Immunohistochemical Tool In Stratifying Endometrial Carcinomas? – *în curs de publicare*.
4. **Evsei, A.**, Birceanu-Corobea, A., Ghita, M., Sajin, M., Mates. I.N. & Copca., N. (2021). Dedifferentiated Endometrial Carcinoma Associated With Endometrial Polyps With Stromal Atypia – A Case Report And Review Of Literature – *în curs de publicare*.

Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale

A. Evsei, A. Birceanu, N. Copca, A. Dumitru, M. Sajin, PD-L1 expression in different molecular subgroups of endometrial carcinomas. *Virchows Arch* (2020) 469 (Suppl 1) :S63.

Reviewer extern – ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Virchows Archiv* (2021) 478:153-190.

Prezentări la manifestări științifice naționale

A. Evsei, Cancerul Endometrial: Abordare multidisciplinară și perspective terapeutice, *Zilele Educației Medicale*, ediția a XII-a, 2019.

Contract de studiu

Bursa ESP Giordano Fellowship – Hospital Parc Tauli, Barcelona, Spania, 1.09.-1.12.2018, având ca obiectiv aprofundarea patologiei aparatului genital feminin și patologiei mamare într-un centru de excelență oncologică, sub îndrumarea Prof. Dr. F. Javier Andreu.