

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

ANATOMIE PATOLOGICĂ

*Aspecte histopatologice în ceea ce privește histogeneza și gradul
de anaplazie a gangliogliomelor*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MARIA SAJIN

Student-doctorand:

ANTONIA-CARMEN LISIEVICI

2021

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

1. GENERALITĂȚI
2. GANGLIOGLIOAME BENIGNE
3. GANGLIOGLIOAME ANAPLAZICE

PARTEA SPECIALĂ

4. IPOTEZE DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE
5. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII
6. VALIDAREA AGLORITMULUI DE GRADARE HISTOPATOLOGICĂ A GANGLIOGLIOAMELOR
 - 6.1. REZULTATE
 - 6.2. DISCUȚII
7. ASPECTE IMUNOHISTOCHIMICE
 - 7.1. REZULTATE
 - 7.2. DISCUȚII
8. VARIABILITATEA INTEROBSERVATOR ÎN CADRUL EVALUĂRII INDICELUI DE PROLIFERARE Ki67
 - 8.1. REZULTATE
 - 8.2. DISCUȚII
9. CONCLUZII
10. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ
11. LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. GENERALITĂȚI

Ganglioglioamele sunt tumori rare al sistemului nervos central, glio-neuronale, ce afectează frecvent populația pediatrică; sunt localizate la nivelul lobului temporal și se disting prin asocierea simptomelor epileptice. Majoritatea ganglioglioamelor sunt benigne, fiind considerate gradul I OMS, dar o minoritate de cazuri prezintă caractere anaplazice (grad III OMS) sau intermediare. Înaintea apariției clasificării Organizației Mondiale a Sănătății a tumorilor sistemului nervos central, din 2006, ganglioglioamele erau împărțite în trei grade histologice: ganglioglioame benigne, ganglioglioame atipice și ganglioglioame anaplazice.

Actualmente, sunt recunoscute doar două grade histologice (benigne și anaplazice), deși este admisă necesitatea implementării gradului intermediar. Acest deziderat nu a fost atins din cauza lipsei de criterii histologice care să permită încadrarea anumitor cazuri în această categorie. Fără prezența de criterii reproductibile și validate prin studii pe loturi largi, această clasificarea ar putea fi doar empirică, nu bazată pe dovezi științifice. Lucrarea de față își propune dezvoltarea unui algoritm de diagnostic pentru a decela acele criterii histologice și imunohistochimice care ar putea permite definirea ganglioglioamelor atipice.

2. GANGLIOGLIOAME BENIGNE

Ganglioglioamele fac parte din categoria de tumori mixte neuro-gliale ale sistemului nervos central; sunt tumori bine diferențiate, constituite din două elemente histologice: una neuronală, alcătuită din neuroni dismorfici și una glială, aceasta din urmă fiind cea care dictează gradul OMS [1]. Cea mai frecvent întâlnită manifestare clinică a ganglioglioamelor cerebrale o reprezintă crizele epileptice. Ganglioglioamele reprezintă 40% dintre tumorile cu potențial epileptogen [2][3].

Din punct de vedere imagistic, într-un studiu efectuat pe 18 cazuri de ganglioglioame, 50% dintre leziuni prezentau aspect strict solid, 33.33% aspect strict chistic, iar 16.66% prezentau aspect mixt (11.1% predominant chistic, iar 5.5% predominant solid, cu mici structuri chistice) [4]. La examinarea prin imagistică prin rezonanță magnetică, leziunile mixte solid-chistice, cu

noduli murali prezintă de obicei hiposemnal în secvența T1 și hipersemnal în secvența T2 (superior lichidului cefalorahidian), datorat aspectului gelatinos al conținutului chistic [5].

Din punct de vedere histologic, gangliogliomele se caracterizează prin prezența a două componente tumorale, una neuronală/ ganglionară și una glială. Tumorile încadrate ca grad I OMS se caracterizează printr-un indice scăzut de proliferare și un prognostic favorabil în contextul rezecției integrale a procesului tumoral [1]. Componenta glială este reprezentată cel mai frecvent de către un astrocitom pilocitic. Aspecte frecvent întâlnite în cadrul gangliogliomelor, martori ai prezenței unei componente neuronale, sunt prezenta fibrelor Rosenthal, a corpiilor granulari eozinofili, precum și a manșoanelor perivasculare.

Din punct de vedere imunohistochimic, componenta glială a gangliogliomelor benigne poate fi identificată cu ajutorul markerului GFAP, iar cea neuronală cu ajutorul Synaptophysinei sau a Chromograninei A. Caracterul neoplazic al componente neuronale poate fi demonstrat cu ajutorul markerului CD34, care este exprimat în majoritatea cazurilor de gangliogliom benign. Această imunoreactivitate poate fi observată sub forma a trei pattern-uri de colorare: solitar/ stelat, grupat și difuz [6], [7]. Gangliogliomele prezintă un indice proliferativ Ki67 cuprins între 1.1% și 2.7%.

3. GANGLIOGLIOAME ANAPLAZICE

Gangliogliomele anaplazice sunt tumori extrem de rare, reprezentând doar 3-5% din totalul gangliogliomelor și prezintă un prognostic nefast, comparativ cu cele de grad I OMS [8]. Din punct de vedere histologic, sunt de asemenea alcătuite dintr-o componentă neuronală și una glială, cea din urmă fiind cea anaplastică. În mod excepțional, au fost descrise rare cazuri în care componenta anaplastică este reprezentată de glioblastom sau de neuroblastom [9]. Gangliogliomele anaplazice se asociază mai frecvent cu recidive tumorale, precum și cu o rată de mortalitate mult mai mare [10].

Din punct de vedere clinic, deși o bună parte din pacienții cu gangliogliome anaplazice se prezintă la medic pentru prezența de crize epileptice, aceștia dezvoltă doar în mod excepțional epilepsie cronică. Aceste tumori au frecvent dimensiuni mari, aspect infiltrativ și la examinarea IRM cu substanță de contrast sunt hipercaptante. Până la 20% dintre cele hipercaptante au priză

de contrast multifocală și numeroase ganglioglioame anaplazice au contur imprecis delimitat [11][12].

Din punct de vedere histologic, gangliogloamele anaplazice – grad III OMS – sunt caracterizate de prezența caracterelor maligne în cadrul componentei gliale și de un marcat polimorfism arhitectural datorat întrepătrunderii celulelor astrocitare anaplazice cu cele neuronale, cu caracter dismorfic [1], [13]. Componenta glială malignă este prezentată cel mai frecvent de către un astrocitom difuz infiltrativ, dar poate fi și un glioblastom (grad IV OMS). Arii de hemoragie, necroză cu sau fără pseudopalisadări și proliferări microvasculare pot fi identificate și susțin prezența unui tumori anaplazice [1], [14].

Din punct de vedere imunohistochimic, indicele de proliferare Ki67 are o valoare controversată, comparativ cu gangliogloamele benigne. Deși majoritatea studiilor susțin că un indice de proliferare peste 10% constituie criteriu de diagnostic pentru gangliogloamele anaplazice, cazuri cu valori ale indicelui Ki67 cuprinse între 5 și 10% sunt adesea dificil de integrat în contextul histologic al cazului și, consecutiv, de încadrat drept gangliogliom benign sau anaplazic [15], [16]. Pe de altă parte, expresia CD34 este mult mai puțin întâlnită în cazurile anaplazice, comparativ cu cele benigne. Mai mult, există autori care susțin că transformarea anaplazică a unui gangliogliom benign este asociată cu pierderea expresiei CD34 [16], [17]. Analiza imunohistochimică a BRAFV600E poate identifica toate cazurile ce prezintă această mutație, confirmate prin analize moleculare (aprox 39%), dar această analiză nu are o specificitate crescută, prezentând reactivitate și pentru anumite cazuri fals-pozitive [11].

4. IPOTEZE DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE

Studiul de față este un studiu de tip retrospectiv, efectuat pe toate cazurile de ganglioglioame diagnosticate în perioada 2011-2020 în cadrul Spitalului Clinic de Urgență Bagdasar Arseni, incluzând atât ganglioglioame de grad I OMS, cât și ganglioglioame anaplazice (grad III OMS). Totalitatea pacienților incluși în studiu însumează 51 de cazuri. În mod particular, s-au evaluat și 11 recidive tumorale ale pacienților incluși în studiu și un caz de transformare anaplazică. Studiul

își propune definirea unui algoritm de gradare a gangliogliomelor și identificarea unor criterii histologice pentru reintroducerea terminologiei de gangliogliom atipic (grad II OMS).

4.1. VALIDAREA ALGORITMULUI DE GRADARE HISTOLOGICĂ A GANGLIOGLIOAMELOR ÎN RAPORT CU RATA DE SUPRAVIEȚUIRE A PACIENȚILOR INCLUȘI ÎN STUDIU.

Toate cazurile incluse în studiu au fost reevaluate din punct de vedere histologic, având în vedere analiza parametrilor vizați în cadrul algoritmului. Dintre acești parametri, enumerăm: subtipul histologic al componentei astrocitare, prezența proliferărilor microvasculare, indicele mitotic evaluat atât în componenta glială, cât și în cea neuronală, gradul de celularitate al tumorii, prezența corpurilor granulari eozinofili și a fibrelor Rosenthal, prezența necrozei, evaluarea cantitativă a componentei ganglionare și prezența infiltratului inflamator cronic dispus perivascular sau difuz. Toate aceste elemente vor fi cumulate sub forma unui scor total. Atât elementele algoritmului, în mod individual, cât și scorul total, urmează a fi corelate cu supraviețuirea, localizarea tumorii, vârsta pacientului, cât și cu diagnosticul histopatologic inițial. Scopul acestui algoritm este identificarea cazurilor cu evoluție atipică și, eventual, chiar al caracterelor histopatologice care ar putea prezice un comportament biologic mai agresiv sau mai blând decât cel care ar fi fost prevăzut pe baza diagnosticului histopatologic inițial.

4.2. ASPECTE IMUNOHISTOCHIMICE

Partea a doua a studiului întreprins în această lucrare constă în evaluarea imunohistochimică a gangliogliomelor, evaluare ce are ca scop scontat atât confirmarea diagnosticului, cât și evaluarea capacității proliferative a tumorii. Primul marker utilizat pentru selectarea cazurilor de tumori care au întradevăr o componentă neuronală este **Synaptophysin**. Cu toate acestea, Synaptophysin nu are capacitatea de a diferenția între tumori astrocitare cu celule neuronale captive și tumori mixte glio-neuronale care includ celule ganglionare atipice, dismorfe. Pentru a dovedi caracterul neoplazic al acestor celule s-a utilizat markerul CD34. Expresia **CD34** în celulele neuronale ale gangliogliomelor este reputată pentru conexiunea cu potențialul epileptogen al acestor tumori. Aceasta poate avea multiple tipuri de expresie: celule solitare, cuiburi celulare sau chiar expresie difuză [6]. De regulă, expresia CD34 este sensibilă pentru detectarea structurilor

vasculare, dar în mod deosebit în ganglioglioame, expresia acestui marker poate fi observată intratumoral.

Dezideratul acestui studiu este stabilirea unei legături între tipurile de expresie CD34 și rata de supraviețuire a pacienților. De asemenea, se dorește evaluarea tipurilor de expresie în relație cu lobul/lobii afectați de către tumoră, precum și cu existența simptomatologiei epileptice. Alt marker imunohistochimic vizat în cadrul studiului imunohistochimic al ganglioglioamelor este markerul surogat **BRAFV600E**. Datele actuale din literatură nu furnizează informații legate de studii efectuate pe loturi mari de ganglioglioame, cu atât mai puțin nu există studii care să analizeze expresia BRAF în mod comparativ între ganglioglioamele benigne (grad I OMS) și ganglioglioamele anaplazice (grad III OMS). Expresia BRAF a fost integrată și în contextul supraviețuirii pacienților, dar și în contextul caracterelor histopatologice ale tumorilor.

4.3. VARIABILITATEA INTEROBSERVATOR ÎN CADRUL EVALUĂRII INDICELUI DE PROLIFERARE KI67

Articolele științifice publicate în literatura de specialitate prezintă ipoteze diferite legate de expresia Ki67 și în mod deosebit legate de pragul indicelui de proliferare **Ki67**, care ar separa ganglioglioamele de grad I de ganglioglioamele anaplazice. Mai mult, majoritatea autorilor sunt de acord că un indice Ki67 sub 2% este argument pentru diagnosticul de gangliogliom benign (grad I OMS) și un indice Ki67 peste 10% este înalt sugestiv pentru diagnosticul de gangliogliom anaplazic (grad III OMS). Totuși, aceste praguri exclud o plajă largă de ganglioglioame cu indice de proliferare variabil între 2% și 10%. Scopul acestui studiu este corelarea indicelui de proliferare Ki67 cu rata de supraviețuire a pacienților, precum și evaluarea variabilității interobservator în cadrul estimării indicelui de proliferare Ki67. În vederea atingerii acestui scop, 6 anatomo-patologi cu grade diferite de experiență (medici rezidenți, specialiști și primari) au fost rugați să evalueze individual lamele colorate cu markerul imunohistochimic Ki67. Toate datele rezultate au fost introduse în cadrul unui document Excel și apoi analizate pentru a evalua diferențele între examinatori în cadrul aceluiași caz.

5. METODOLOGIA DE CERCETARE

Pentru constituirea bazei de date, blocurile de parafină aferente fiecărui caz și stocate în arhiva Serviciului de Anatomie Patologică a Spitalului Bagdasar Arseni au fost resecționate și reevaluate.

În vederea validării algoritmului de diagnostic histopatologic, lamele rezultate în urma resecționării au fost colorate în colorația uzuală Hematoxilină-Eozină, colorația specială Van Gieson și colorațiile imunohistochimice Ki67 (clona SP6, producător Biocare Medical) și Synaptophysin (clonă 27G12, producător Biocare Medical). Protocoalele de colorare histochimică și imunohistochimică au fost detaliate în cadrul capitolului 5.

Lamele colorate au fost apoi reexamineate cu ajutorului microscopului optic Carl Zeiss-varianta Axio Imager.A2. În cadrul reexaminării s-au evaluat și gradat următoarele elemente:

a. Elemente ale componente gliale

Acestea includ: subtipul histopatologic al componente astrocitare (astrocitom pilocitic, astrocitom difuz infiltrativ etc), indice mitotic, tipul de proliferărilor microvasculare, prezența sau absența necrozei, prezența fibrelor Rosenthal și a corpiilor granulari eozinofili, gradul de celularitate;

b. Elemente ale componente neuronale

Acestea sunt reprezentate de: estimarea cantitativă a componente ganglionare, prezența infiltratului inflamator caracteristic componente neuronale (manșoane perivasculare), prezența mitozelor neuronale.

Pentru analiza imunohistochimică, blocurile de parafină au fost resecționate, iar lamele rezultate au fost apoi colorate cu markerii imunohistochimici CD34 (clona QBEnd-10, producător Biocare Medical), BRAFV600E (clonă RM8, producător Abcam) și Synaptophysin (clona 27G12, producător Biocare Medical). Lamele rezultate au fost apoi evaluate și fotografiate cu ajutorul microscopului optic Carl Zeiss-varianta Axio Imager.A2, dotat cu sistem de fotografiere integrat.

Evaluarea lamelor imunomarcate cu CD34 s-a desfășurat conform următorului protocol, propus de autori consacrați în literatura de specialitate [6], [7]. În funcție de tipul arhitectural de

imunoreactivitate al CD34, cazurile puteau fi încadrate ca negative și pozitive – tipul solitar/stelat, tipul grupat sau difuz.

Similar, s-a efectuat și o interpretare în funcție de caracterul imunoreactivității pentru markerul BRAFV600E, conform observațiilor făcute de către Durślewicz et al. [18]. Cazurile în care nu se observă imunoreactivitate citoplasmatică, au fost considerate ca fiind negative pentru BRAFV600E. Cazurile în care se observă imunomarcaj citoplasmatic, dar acesta prezintă intensitate redusă sunt considerate slab pozitive, iar cele cu intensitate crescută, intens pozitive. Pentru dezvoltarea părții de analiză a variabilității interobservator a indicelui de proliferare Ki67 în cadrul ganglioglioamelor benigne și anaplastice, s-a utilizat clona SP6, de la producătorul Biocare Medical. Șase anatomopatologi cu grade diferite de experiență în neuropatologie și imunohistochimie (doi medici rezidenți în an terminal, doi medici specialiști și doi medici primari) au participat în acest studiu.

Pentru a elimina diferența dintre observatori cauzată de metodele diferite de interpretare a indicelui de proliferare Ki67, s-a ales un consens de interpretare al acestuia. Acesta constă în estimarea indicelui Ki67 pe o arie de 1 mm², care să includă și zona de hotspot. Această variantă ar putea duce la o estimare adecvată a indicelui Ki67 și ar fi permis și o concordanță între examinatori. Dezavantajul principal al acestei metode constă în faptul că fiecare examiner ar trebui să își calculeze câte câmpuri x400 însumează o arie de 1 mm². În plan secundar, având în vedere tipul de material patologic prelevat în cadrul operațiilor chirurgicale, reprezentat de piese multifragmentare, cu dimensiuni variate, există riscul ca microfragmentul ce conține “hotspotul”, să aibă dimensiuni sub 1 mm².

6. VALIDAREA ALGORITMULUI DE DIAGNOSTIC HISTOPATOLOGIC

6.1. REZULTATE

Din punct de vedere epidemiologic, din cei 51 de pacienți incluși în studiu, 56.9% (29) erau de gen masculin, iar 43.1% (22) erau de gen feminin. Vârsta pacienților a variat între 3 și 81 de ani, cu o valoare medie de 36.36 ani, cu un interval de încredere 95% (31.08, 42.64). Din punct de vedere al localizării tumorii, 52% (26) dintre cazuri interesau emisfera dreaptă, 36% (18) interesau emisfera stângă, iar 12% (6) erau localizate pe linia mediană, infratentorial. În mod particular, s-a

observat o legătură de asociere puternică (test Cramer V: 0.701) între localizarea temporală a tumorii și prezența epilepsiei.

Analizând relația dintre prezența epilepsiei și vârsta pacienților, s-a demonstrat, cu un nivel de încredere de 95%, că există diferențe semnificative statistic între vârsta pacienților cu epilepsie și cea a celor fără epilepsie, diferența medie fiind de 13.28 ani.

PARAMETRI HISTOLOGICI

Prezența corpurilor granulari eozinofili a demonstrat o legătură puternică cu rata de supraviețuire (valoare $p=0.023$). Analiza Crosstab arată o asociere puternică între supraviețuirea crescută și celularitatea redusă (65.71% dintre cei în viață), precum și o legătură între mortalitatea crescută și hipercelularitate (75% dintre cei decedați) (valoare $p=0.001$).

Analizele Cramer V și Phi prin care s-a evaluat nivelul de asociere dintre mortalitate și componenta anaplazică glială au arătat o valoare de 0.536, indicativă pentru o legătură foarte puternică (valoare $p=0.001$). Analizând relația dintre prezența necrozei, și implicit, subtipurile de necroză și survenirea decesului s-a observat o legătură medie spre puternică între supraviețuirea crescută și absența necrozei. Totuși, din punct de vedere statistic, valoarea $p=0.127$ indică absența semnificației statistice, posibil datorată numărului relativ scăzut de decese în cadrul lotului evaluat.

Majoritatea cazurilor prezentau doar mitoze ocazionale (45.1%), pe când mitoze frecvente au fost întâlnite în 7.8% din cazuri. 100% dintre cazurile de gangliogliome anaplazice prezentau mitoze gliale atipice, acestea fiind estimate ca frecvente în 33% dintre cazuri. S-a observat o legătură medie spre puternică între absența mitozelor sau prezența mitozelor rare și supraviețuirea pacienților. Valoarea testului Cramer V este de 0.492, cu o semnificație statistică crescută (valoare $p=0.002$).

Mitozele neuronale au fost observate în doar 7.8% din totalul de cazuri, în timp ce 92.2% dintre cazuri nu prezentau mitoze neuronale evidente. Prezența mitozelor neuronale a fost observată în 25% dintre cazurile de gangliogliome anaplazice. Relația de legătură dintre prezența mitozelor neuronale și survenirea decesului a fost analizată și s-a observat o incidență mai crescută a mitozelor neuronale în cadrul pacienților care au decedat secundar prezenței proliferării tumorale (valoare $p=0.005$).

Rare elemente histologice suplimentare, au fost identificate într-un subset de cazuri, fără a se corela cu alte date clinice, histologice sau prognostice (ex: calcosferite, reacții granulomatoase de corp străin).

MORTALITATE ȘI RECURENȚE TUMORALE

Decesul a survenit în 31.37% (16) din totalitatea cazurilor incluse în studiu, indiferent de gradul histologic al cazurilor evaluate. În ganglioglioamele benigne, decesul a survenit în 23.08% (9) dintre cazuri, în timp ce 76.92% dintre pacienți erau încă în viață în momentul întocmirii bazei de date. Rata crescută a deceselor a demonstrat o legătură puternică cu absența corpiilor granulari eozinofili, concluzie indicată de analiza Cramer V ce a măsurat o valoare de 0.283, cu o valoare p de 0.043. De asemenea, hipercelularitatea crescută s-a corelat cu apariția crescută a deceselor (valoare Cramer V= 0.608, valoare P = 0.000). Rata de decese scăzută s-a corelat mai degrabă cu o componentă glială cu caractere histopatologice de astrocitom pilocitic (Cramer V= 0.536 și valoare P= 0.001).

De asemenea, rata crescută a deceselor s-a corelat puternic și cu prezența mitozelor gliale, indiferent de frecvența acestora (valoare Cramer V= 0.492, valoare P= 0.002). O frecvență crescută a mitozelor neuronale a demonstrat o legătură puternică și cu prezența mitozelor neuronale (Cramer V= 0.274, valoare P= 0.050).

Rata de recidive în cadrul întregului lot de pacienți evaluat se ridică la 21.57% (11) dintre cazuri. În cadrul ganglioglioamelor evaluate ca fiind grad I OMS, 17.95% au prezentat recidive tumorale, în timp ce 33.33% dintre ganglioglioamele anaplazice au prezentat recidive tumorale. Dintre pacienții decedați, 25% (4) au prezentat recidive tumorale, în timp ce 75% nu au avut istoric de recurențe tumorale.

S-au efectuat testul Levene pentru evaluarea diferențelor dintre cele două grupuri evaluate (decedați și în viață) și testul t pentru evaluarea diferențelor dintre scorul histologic total între cele două grupuri. Astfel, s-a observat că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între scorul histologic total evaluat în cadrul pacienților decedați și cel al celor în viață. Scorul total al pacienților decedați este în medie cu 4.6 puncte mai mic decât al celor decedați. Similar, s-a demonstrat că vârsta pacienților în viață este cu aproximativ 18.5 ani mai mică decât a celor decedați.

ALGORITMUL DE DIAGNOSTIC PROPUȘ

În urma reclasificării ganglioglioamelor în trei grade, elementele histologice și-au păstrat legăturile puternice de asociere față de caracterul benign al proliferării tumorale. Astfel, prezența corpiilor granulari eozinofili s-a asociat puternic cu ganglioglioamele de grad I și II ($p= 0.001$), iar nivelul de celularitate redus s-a asociat puternic cu ganglioglioamele de grad I ($p= 0.001$). Componenta glială de tip pilocitic s-a asociat puternic cu ganglioglioamele de grad I ($p= 0.001$), iar absența necrozei s-a asociat puternic cu caracterul benign al ganglioglioamelor ($p= 0.001$).

Conform algoritmului propus, 27.5% dintre ganglioglioamele benigne au fost reclasificate drept ganglioglioame de grad II, iar rata mortalității în cadrul ganglioglioamelor benigne a scăzut de la 23.08% la 8%. Scorul histologic total al ganglioglioamelor de grad I a fost mai mic cu o medie de 3.58 puncte, comparativ cu ganglioglioamele de grad II și cu 10.24 puncte față de ganglioglioamele anaplazice. Valoarea indicelui de proliferare Ki67 în cadrul ganglioglioamelor anaplazice a fost cu până la 14.29 procente mai mare decât în cadrul ganglioglioamelor benigne. Doar pentru examinatorul 4 s-au observat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între valorile Ki67 estimate pentru ganglioglioamele de grad II și cele de grad III, diferența medie fiind de 8.04 procente.

6.2. DISCUȚII

Simptomele epileptice au fost identificate în 58.8% dintre cazuri, în timp ce literatura de specialitate raportează crizele epileptice ca fiind primul simptom al pacienților într-un procent variabil cuprins între 62% și 100% [3]. Analizele statistice efectuate au demonstrat o legătură puternică de asociere între prezența simptomelor epileptice și localizarea temporo-frontală, date similare celor raportate în literatură [5]. Studiul de față a mai observat și o asociere între vârsta tânără a pacienților și prezența epilepsiei.

Din punct de vedere histopatologic, studiul de față a reliefat, prezența componentei astrocitare de tip pilocitic în 82.5% dintre cazurile de gangliogliom benign, rezultate similare anumitor studii din literatură [19], dar în opoziție cu observațiile făcute de anumiți autori care remarcă prezența astrocitomului fibrilar (actualmente astrocitom difuz) în până la 59% dintre cazuri [20][21].

În ceea ce privește ganglioglioamele anaplazice, literatura raportează ca fiind necesară prezența a cinci mitoze pe 10 câmpuri de magnificație crescută (obiectiv x40), însoțită de prezența

ariilor de necroză sau de prezența proliferărilor microvasculare pentru a efectua acest diagnostic [22]. În studiul efectuat pe lotul nostru ariile de necroză au fost prezente în 91.67% dintre cazurile de gangliogliom anaplastic, iar mitozele frecvente, echivalentul a peste 5 mitoze/10 HPF au fost identificate doar în 33.33% dintre cazuri.

Mitotele neuronale au fost raportate în cazuri excepționale în literatura de specialitate [23], iar prezența acestora, asociată cu marcat pleomorfism și atipie celulară pot conduce la constituirea unei tumori maligne ganglionare [24]. Această afirmație a fost susținută și de datele din studiul de față, în care mitozele neuronale au fost observate în 25% dintre cazurile de gangliogliome anaplastice. Prezența mitozelor neuronale a demonstrat o relație de legătură și cu survenirea decesului în cadrul lotului studiat. De asemenea prezența acestora s-a asociat cu indici de proliferare Ki67 semnificativ mai crescuți decât cei observați în cazurile fără mitoze neuronale.

Analizând rata de decese în cadrul lotului studiat, s-a observat o asociere puternică între prezența corpișorilor granulari eozinofili (valoare $p=0.043$) și rata scăzută a mortalității, în timp ce hiper celularitatea poate fi considerată un factor de prognostic advers (valoare $p=0.001$), datorită asocierii acesteia cu o rată crescută a deceselor. Prezența mitozelor neuronale s-a asociat de asemenea cu o evoluție fatală (valoare $p=0.05$). Analizând componenta glială a proliferărilor tumorale, prezența caracterelor histologice compatibile cu un astrocitom pilocitic se asociază cu o evoluție favorabilă a bolii și, în consecință, cu o rată a mortalității scăzută (valoare $p=0.001$). Pacienții care au avut evenimente fatale, secundare leziunii tumorale, au avut un scor histologic total mai mare, cu o medie de 4.6 puncte, comparativ cu cei care au supraviețuit. Similar, vârsta celor care au supraviețuit s-a observat a fi cu 18.5 ani mai mică decât a celor care au decedat. Variația indicilor de proliferare Ki67 între grupul de pacienți care au decedat și cei în viață a demonstrat o valoare mai mare a indicelui Ki67 în cadrul celor decedați, cu o diferență medie variabilă cuprinsă între 5.7 și 8.4 procente, în funcție de examinătorul care a interpretat analiza.

Clasificarea histologică permite o diviziune corespunzătoare a gangliogliomelor în raport cu rata mortalității, aceasta scăzând de la 23.08% la 8% în cadrul gangliogliomelor benigne. Dintre gangliogliomele anaplastice, doar un număr scăzut de cazuri au suferit reclasificări în sensul schimbării gradului de anaplazie.

7. ASPECTE IMUNOHISTOCHIMICE

7.1. REZULTATE

CD34

Expresia imunohistochimică a CD34 a fost observată în 94.12% (48) din cazuri. Dintre acestea, 35.42% exprimau doar în celule neuronale izolate, 35.42% exprimau CD34 în celule gupate (pattern „cluster/bushy”), în timp ce patternul difuz a fost întâlnit în 29.17% dintre cazuri.

Notabilă este asocierea strânsă dintre expresia difuză a markeului IHC CD34 și localizarea în lobul temporal a tumorii. Astfel, 64.29% din totalul tumorilor ce prezentau expresie difuză a markerului CD34, erau localizate la nivelul lobului temporal.

Referitor la gangliogloamele anaplazice, expresia imunohistochimică a markerului CD34 a fost observată în 83.33% dintre cazuri. În timp ce doar 16.67% din totalul gangliogloamelor anaplazice exprimau CD34 sub formă de celule neuronale solitare, 33.33% exprimau sub forma patternului grupat, iar alte 33% dintre cazuri exprimau difuz acest marker.

BRAFV600E

Expresia imunohistochimică BRAFV600E a fost observată în 41.8% (25) dintre cazuri, în timp ce în 51.9% dintre cazuri nu s-a observat imunoreactivitate pentru BRAFV600E, sau se observa doar la nivel nuclear.

În cadrul gangliogloamelor benigne, imunoreactivitatea pentru BRAFV600E a fost observată sub forma următoarelor patternuri: 58.97% nu prezentau deloc imunoreactivitate pentru acest marker, 7.69% exprimau doar focal și slab, în timp ce expresia difuză a fost observată în 33.33% dintre cazuri.

Comparativ, în gangliogloamele anaplazice 30.77% nu prezentau imunoreactivitate pentru BRAFV600E, 30.77% exprimau doar focal, cu intensitate slabă acest marker, iar 38.46% prezentau imunoreactivitate difuză pentru acest marker.

7.2. DISCUȚII

Referitor la expresia CD34, patternul grupat a fost raportat într-un procent de cazuri variabil, cuprins între 55% [25] și 74% [6] din totalul cazurilor pozitive pentru CD34, în timp ce în studiul efectuat în cadrul acestei lucrări 34.69% prezentau imunoreactivitate sub forma acestui pattern.

Expresia difuză a markerului imunohistochimic CD34 a fost raportată în literatură în până la 55% dintre cazuri [7], în timp ce în studiul nostru doar 30.61% din totalul de cazuri ce prezentau imunoreactivitate pentru acest marker, se manifestau sub forma acestui pattern. În studiul de față, notabilă este asociere între expresia difuză a markerului IHC CD34 și localizarea la nivelul lobului temporal a tumorii. Astfel, 62.29% dintre cazurile ce exprimau difuz CD34 au fost localizate la nivel temporal.

În lotul de pacienți cu gangliogliome benigne, expresia BRAFV600E a fost observată în 41.03% din cazuri, majoritatea prezentând chiar imunoreactivitate intensă și difuză (33% din totalul gangliogliomelor benigne). Din totalul gangliogliomelor anaplastice, 30.77% nu prezentau imunoreactivitate pentru BRAFV600E, 30.77% prezentau imunoreactivitate slabă, cu caracter focal și 38.46% prezentau imunoreactivitate intensă și difuză.

8. EVALUAREA IMUNOHISTOCHIMICĂ A INDICELUI DE PROLIFERARE KI67

8.1. REZULTATE

S-a observat o corelație puternică între indicii de proliferare Ki67 și scorul total rezultat în urma reanalizării cazurilor. Indiferent de nivelul de experiență al examinatorilor, analiza Kendall's tau-b arată corelație semnificativă din punct de vedere statistic între scorul total și valorile indicilor de proliferare estimate de către fiecare examinator în parte. Valoarea p pentru aceste analize este <0.001.

De asemenea, s-a dorit demonstrarea corelației dintre o valoare înaltă a indicelui de proliferare Ki67 și o evoluție fatală a bolii neoplazice. Valoarea medie a indicelui de proliferare în cadrul grupului de pacienți decedați a variat între 9.58% și 13.70%, în funcție de examinatorul care a efectuat evaluarea; comparativ, în cadrul grupului de pacienți care au supraviețuit, valoarea indicelui de proliferare a variat între 3.68% și 5.42%. Testul t a demonstrat că există diferențe semnificative între cele două grupuri, indiferent de examinatorul care efectua evaluarea.

Referitor la prezența mitozelor neuronale, valoarea indicelui de proliferare Ki67 în cadrul pacienților cu mitoze neuronale a variat între 13.75% și 18.57%; comparativ, în grupul celor fără mitoze neuronale, valoarea indicelui de proliferare a variat între 5.29 și 7.19%, în funcție de

examinatorul care a efectuat evaluarea. Testul t a demonstrat că există diferențe semnificative între cele două grupuri (valoarea $p < 0.005$).

Nu s-au observat diferențe între indicii de proliferare observați în cadrul grupului de pacienți care au suferit recidive tumorale, comparativ cu cei care nu prezentau recurențe. În urma analizei variabilității interobservator în cadrul evaluării indicelui de proliferare Ki67, nu s-au observat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între valorile estimate de cei șase examinatori. De asemenea, nici în urma grupării examinerilor în funcție de nivelul de experiență, nu s-au observat diferențe semnificative interobservator.

Similar algoritmului de gradare histologică propus, s-a dorit implementarea și a unor valori prag ale indicelui de proliferare Ki67 care să permită divizarea gangliogliomelor în trei grade de anaplazie. Valorile prag obținute în urma testelor efectuate au fost următoarele: o valoare mai mică sau egală cu 3% ar fi aferentă gangliogliomelor benigne, o valoare Ki67 cuprinsă între 3% și 10% ar fi aferentă gangliogliomelor de grad II, iar cele anaplazice ar trebui diagnosticate în urma unei valori a indicelui de proliferare mai mare de 10%. În urma acestei reclasificări, rata mortalității în cadrul gangliogliomelor benigne a scăzut la 8% și până la 54.55% din totalul cazurilor de gangliogliome atipice și anaplazice au avut evenimente fatale. Cea mai bună concordanță între clasificarea histologică propusă și cea imunohistochimică, s-a observat pentru gangliogliomele de grad I, care își păstrau caracterul benign în proporție de 92% dintre cazuri. Comparativ, în cadrul gangliogliomelor de grad II diagnosticate în urma clasificării histologice, doar 50% își mențin această încadrare, iar dintre cele anaplazice până la 37% vor fi reclasificate în urma analizei imunohistochimice.

8.2. DISCUȚII

Clasificarea actuală OMS afirmă că valoarea medie a indicelui proliferativ se află în intervalul 1.1% și 2.7%, dar nu oferă un interval similar pentru gangliogliomele anaplazice [1]. S-a observat o relație de legătură între dimensiunile mici ale tumorilor și valorile mici ale indicilor de proliferare Ki67. Analiza Kendall tau-b a demonstrat o legătură puternică între indicele de proliferare Ki67 și scorul histologic total, detaliat în tabelul VI.1. din teza de doctorat. Valoarea p în cadrul acestei analize a fost de 0.0001.

De asemenea, s-a observat o legătură directă, de intensitate puternică între valoarea indicelui de proliferare Ki67 și evoluția fatală a bolii. Astfel, în cadrul grupului de pacienți decedați,

valoarea indicelui Ki67 era mai mare cu până la 8.4%, decât în cadrul grupului de pacienți în viață. Similar, valoarea indicelui de proliferare Ki67 în cadrul grupului de pacienți ce prezentau mitoze neuronale a fost cu până la 12.21% mai mare decât în cadrul grupului fără mitoze neuronale (valoare $p=0.001$). Diferențe între cele două grupuri s-au observat indiferent de examinatorul care a estimat valorile, mai puțin pentru examinatorul 1, la care nu s-au observat diferențe semnificative din punct de vedere statistic.

Clasificarea propusă în funcție de valorile prag ale indicelui de proliferare Ki67 se corelează puternic cu rata mortalității și prezintă o concordanță înaltă față de clasificarea histologică pentru gangliogliomele benigne.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Principala contribuție personală adusă cercetării în cadrul gangliogliomelor o reprezintă chiar schema algoritmică prezentată mai jos, ce își propune a sta la baza viitoarelor interpretări ale cazurilor de gangliogliome. Noul algoritm se corelează cu elementele histologice ce s-au dovedit a avea un impact asupra supraviețuirii, dintre care enumerăm: nivelul de celularitate, prezența necrozei, mitozele neuronale și mitozele gliale. Clasificarea histologică propusă conform algoritmului are impact asupra supraviețuirii, rata deceselor în cadrul gangliogliomelor de grad I scăzând de la 23.08% la 8%.

Gangliogliomele de grad II au avut un scor histologic total mai mic cu o medie de 6.67 puncte față de cele anaplastice. (valoarea $p < 0.05$), iar vârsta celor care au supraviețuit s-a observat a fi cu 18.5 ani mai mică decât a celor care au decedat. De asemenea, pacienții care au avut evenimente fatale au avut un scor histologic total mai mare cu o medie de 4.6 puncte, comparativ cu cei care au supraviețuit. Indicele de proliferare Ki67 a fost în medie cu până la 8.4 procente mai mare în cadrul pacienților care au decedat.

Referitor la analizele imunohistochimice, absența imunoreactivității pentru CD34 sau expresia acestuia doar în celule neuronale solitare poate reprezenta un factor prognostic negativ, având în vedere rata crescută a deceselor observată în cadrul acestor pacienți. Nu s-au observat diferențe

semnificative interobservator în cadrul evaluării imunohistochemice a indicelui de proliferare Ki67, nici între cei șase examinatori și nici între grupurile de examinatori cu experiențe diferite.

Indicele Ki67 a demonstrat o creștere exponențială în cadrul gangliogliomelor ce nu exprimau deloc CD34, iar valoarea indicelui de proliferare s-a corelat puternic cu prezența mitozelor gliale, dar și cu cele neuronale. Referitor la diferențele dintre valorile indicilor de proliferare Ki67 între grupurile de gangliogliome stabilite conform algoritmului, s-a putut observa că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între gangliogliomele de grad I și cele de grad III, diferența fiind de până la 14.29%.

Clasificarea imunohistochimică propusă conform indicelui de proliferare Ki67 presupune propunerea unor valori prag pentru indicele de proliferare Ki67 în vederea separării acestora în trei grade. Aceste grade s-au corelat puternic cu rata mortalității. Pentru gangliogliomele de grad I, se observă o superpozabilitate extrem de bună între clasificarea histologică și cea imunohistochimică (până la 92%), în timp ce pentru gangliogliomele de grad II, în urma aplicării clasificării IHC, până la 50% dintre cazuri pot fi reclasificate în gangliogliome de grad I sau III.

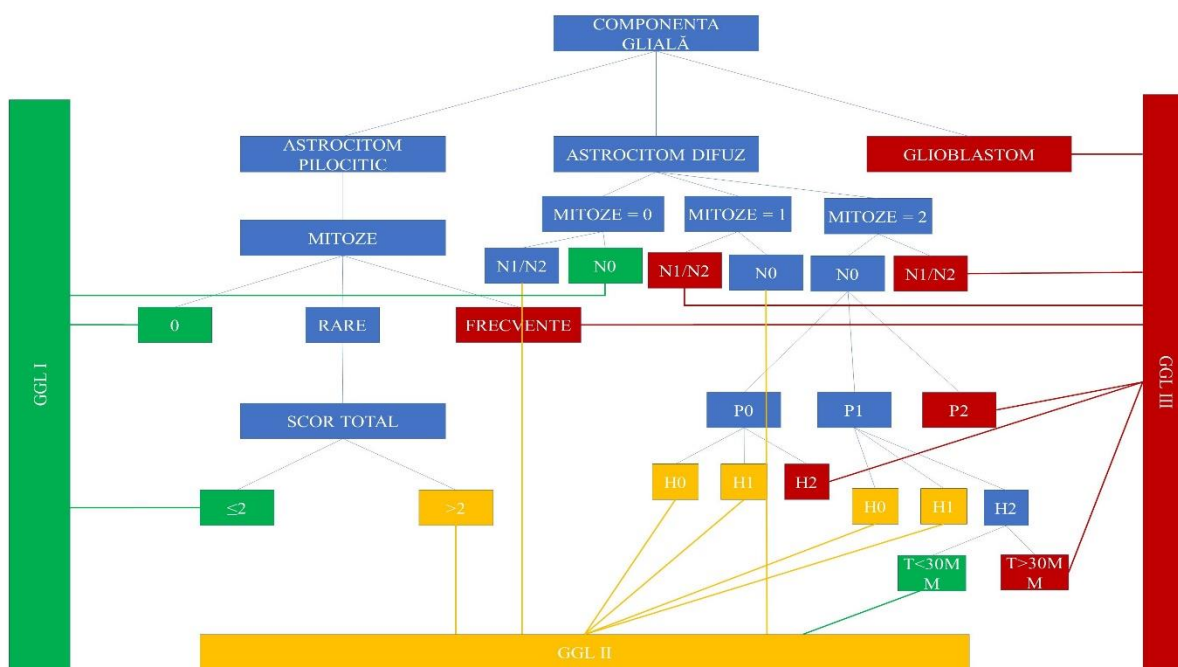


Fig. 8.1. Algoritm de diagnostic propus, bazat pe elementele analizate în cadrul scorului histologic. Legendă: N- necroză; P- proliferări microvasculare; H- hipercelularitate, T- dimensiunea maximă a tumorii; GGL: gangliogliom.

BIBLIOGRAFIE

- [1] A. von D. David N. Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, David W. Ellison, Dominique Figarella-Branger, Arie Perry, Guido Reifenberger, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4th editio. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.
- [2] J. M. Silver, C. E. Rawlings, E. Rossitch, S. M. Zeidman, and A. H. Friedman, "Ganglioglioma: a clinical study with long-term follow-up.," *Surg. Neurol.*, vol. 35, no. 4, pp. 261–6, Apr. 1991.
- [3] W. H. Hu, M. Ge, K. Zhang, F. G. Meng, and J. G. Zhang, "Seizure outcome with surgical management of epileptogenic ganglioglioma: A study of 55 patients," *Acta Neurochir. (Wien).*, vol. 154, no. 5, pp. 855–861, May 2012.
- [4] M. Castillo, P. C. Davis, Y. Takei, and J. C. Hoffman, "Intracranial Ganglioglioma: MR, CT, and Clinical Findings in 18 Patients," *Am J Roentgenol*, vol. 154, no. 3, pp. 607–12, 1990.
- [5] C. Di Rocco and G. Tamburrini, "Ganglioglioma," *Neuro-Oncology CNS Tumors*, pp. 393–400, 2006.
- [6] I. Blümcke *et al.*, "The CD34 epitope is expressed in neoplastic and malformative lesions associated with chronic, focal epilepsies," *Acta Neuropathol.*, vol. 97, no. 5, pp. 481–490, May 1999.
- [7] P. Deb, M. C. Sharma, M. Tripathi, P. Sarat Chandra, A. Gupta, and C. Sarkar, "Expression of CD34 as a novel marker for glioneuronal lesions associated with chronic intractable epilepsy," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 461–468, 2006.
- [8] D. H. Kang, C. H. Lee, S. H. Hwang, I. S. Park, J. W. Han, and J. M. Jung, "Anaplastic ganglioglioma in a middle-aged woman: A case report with a review of the literature," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 22, no. SUPPL. Korean Academy of Medical Sciences, p. S139, Sep-2007.
- [9] A. Tarnaris, C. O'Brien, and R. M. Redfern, "Ganglioglioma with anaplastic recurrence of the neuronal element following radiotherapy," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 108, no. 8, pp. 761–767, Dec. 2006.
- [10] R. E. McLendon, M. K. Rosenblum, and D. D. Bigner, *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*, 7th ed. CRC Press, 2006.
- [11] M. Zanello *et al.*, "Clinical, Imaging, Histopathological and Molecular Characterization of Anaplastic Ganglioglioma," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 75, no. 10, pp. 971–980, Oct. 2016.
- [12] S. Bouali, N. Maatar, A. Zehani, M. Mahmoud, J. Kallel, and H. Jemel, "A case of adult anaplastic cerebellar ganglioglioma," *Surg. Neurol. Int.*, vol. 9, no. 1, Jan. 2018.

- [13] D. C. Miller, F. F. Lang, and F. J. Epstein, “Central nervous system gangliogliomas. Part 1: Pathology,” *J. Neurosurg.*, vol. 79, no. 6, pp. 859–866, Dec. 1993.
- [14] A. Perry and D. J. Brat, *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach: A Volume in the Pattern Recognition Series, Expert Consult: Online and Print, 1e*. Churchill Livingstone; 1 Har/Psc edition, 2010.
- [15] S. Love, H. (Herbert) Budka, J. W. Ironside, and A. Perry, *Greenfield’s neuropathology*, 9th edition. CRC Press, 2015.
- [16] M. A. Hayat, *Tumors of the Central Nervous System, Volume 9: Lymphoma, Supratentorial Tumors, Glioneuronal Tumors, Gangliogliomas, Neuroblastoma in Adults, Astrocytomas, Ependymomas, Hemangiomas, and Craniopharyngiomas*, vol. 9. Springer, 2012.
- [17] I. Blümcke and O. D. Wiestler, “Gangliogliomas: An intriguing tumor entity associated with focal epilepsies,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 61, no. 7, pp. 575–584, 2002.
- [18] J. Durślewicz *et al.*, “Detection of BRAF V600E Mutation in Ganglioglioma and Pilocytic Astrocytoma by Immunohistochemistry and Real-Time PCR-Based Idylla Test,” *Dis. Markers*, vol. 2020, 2020.
- [19] C. Tan and R. McLendon, “Histological approach to neuronal and mixed neuronal-glia tumors of the central nervous system,” *Glioma*, vol. 1, no. 3, p. 89, 2018.
- [20] H. M. Diepholder, K. Schwechheimer, M. Mohadjer, R. Knoth, and B. Volk, “A clinicopathologic and immunomorphologic study of 13 cases of ganglioglioma,” *Cancer*, vol. 68, no. 10, pp. 2192–2201, Nov. 1991.
- [21] T. Hirose, B. W. Scheithauer, M. B. S. Lopes, H. A. Gerber, H. J. Altermatt, and S. R. Vandenberg, “Ganglioglioma,” *Cancer*, vol. 79, no. 5, pp. 989–1003, Mar. 1997.
- [22] S. Bouali *et al.*, “Pediatric Intracranial Anaplastic Gangliogliomas: Illustrative Case and Systematic Review,” *World Neurosurg.*, vol. 119, pp. 220–231, 2018.
- [23] B. Kleinschmidt-DeMasters, F. J. Rodríguez, and T. Tihan, *Diagnostic pathology. Neuropathology*, Second ed. 2016.
- [24] M. Kaymak-Cihan, E. Erdiř, S. Bozkurt, and E. Ünver-Korğalı, “Pediatric primary anaplastic ganglioglioma with malignant neuronal component,” *Turk. J. Pediatr.*, vol. 60, no. 1, pp. 102–106, 2018.
- [25] C. Chappé *et al.*, “Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors Share with Pleomorphic Xanthoastrocytomas and Gangliogliomas BRAFV600E Mutation and Expression,” *Brain Pathol.*, vol. 23, no. 5, pp. 574–583, Sep. 2013.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

Articole științifice publicate în reviste de specialitate

1. **Lisievi AC**, Georgescu TA, Pașov D, Tașcu A, Lisievi MG, Sajin M. „Grading Gangliogliomas: a Short Case Series With Clinico-Imagistic and Immunohistopathological Correlations.”, *Maedica (Buchar)*., vol. 13, nr. 3, pp. 241-249, 2018. DOI: [10.26574/maedica.2018.13.3.241](https://doi.org/10.26574/maedica.2018.13.3.241)
2. **Lisievi, A. C.**, Pașov, D., Georgescu, T. A., Lisievi, M. G., & Sajin, M., “A novel histopathological grading system for ganglioglioma.” *Journal of medicine and life*”, vol. 14, nr. 2, pp 170-175, (2021), DOI: [10.25122/jml-2021-0054](https://doi.org/10.25122/jml-2021-0054)
3. **Lisievi AC**, Pop F, Barbu S, Georgescu TA, Pașov D, Lisievi MG, Sajin M. Interobserver variability regarding Ki67 proliferation index evaluation in ganglioglioma and anaplastic ganglioglioma. *Arch Balk Med Union*. 2021;56(2):157-164, DOI:[10.31688/ABMU.2021.56.2.03](https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.2.03)

Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale

1. **A.C. Lisievi**, T. A. Georgescu, D. Pașov, M.-G. Lisievi, “Abundant eosinophilic granular bodies in a case of cerebellar anaplastic ganglioglioma: a possible clue for malignant transformation of low-grade ganglioglioma”, *Virchows Arch*, 473 (Suppl 1):S140, 2018.