

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
HEMATOLOGIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**EFECTELE MICROMEDIULUI TUMORAL ASUPRA
SUPRAVIEȚUIRII PACIENȚILOR CU LIMFOM DIFUZ
CU CELULĂ MARE B**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. Anca Roxana Lupu

Doctorand:

DR. Birceanu-Corobea Adelina Lucreția

București

2018

CUPRINS

Introducere	3
Partea generală	9
Particularități ale țesutului limfoid ganglionar și extraganglionar	10
Limfoganglionul	10
Splina	11
Măduva hematogenă	12
Timusul	13
Țesutul limfoid asociat mucoaselor (MALT)	14
Incidența și epidemiologia în limfomul non-Hodgkin B difuz cu celula mare	16
Clasificarea, tabloul clinic și factori de prognostic clinici în limfomul Non-Hodgkin difuz cu celulă mare B	18
Clasificarea limfoamelor non-Hodgkin B difuz cu celula mare	18
Aspecte clinice	25
Boli autoimune, transplantul și imunosupresia	27
Agenti infecțioși	28
Translocații cromozomiale și modificări genetice	29
Aspecte imunofenotipice și moleculare cu importanță clinică	32
Factori de mediu	33
Diagnostic, stadializarea și modalități terapeutice în limfomul non-Hodgkin difuz cu celulă mare	35
Diagnosticul în limfomul B difuz cu celulă mare	34
Stadializarea în limfomul B difuz cu celulă mare	38
Tratament	41

Evaluarea și rolul micromediului tumoral în limfomul non-Hodgkin B difuz cu celulă mare	43
Partea specială	48
Scopul lucrării și justificarea studiului	49
Obiective	51
Material și metodologia cercetării	52
Rezultate	61
Discuții	163
Concluzii	176
Referințe	180
Anexe	210

INTRODUCERE

Limfomul malign non-hodgkin reprezintă la ora actuală, cea mai frecventă hematopatie malignă și incidența sa prezintă o creștere constantă.

Teza își propune ca scop analiza retrospectivă a rezultatelor tratamentelor efectuate la pacienții cu DLBCL (Limfomul difuz cu celulă mare B), în funcție de parametrii clinico-biologici, imunohistochimici și moleculari concretizate în: reducerea masei tumorale, evaluarea răspunsului terapeutic, durata răspunsului la terapie, apariția recidivei bolii, reevaluarea statusului de performanță clinică, analiza mortalității și a supraviețuirii pacienților.

Justificarea acestui studiu, al analizei rezultatelor terapeutice în DLBCL în funcție de parametrii clinico-biologici, imunohistochimici și moleculari, rezidă din necesitatea cunoașterii cât mai corecte a prognosticului acestor pacienți, acest lucru reprezentând o preocupare pe plan național și internațional a clinicienilor și cercetătorilor.

Recunoașterea faptului că diversele subtipuri de boală necesită abordări terapeutice diferite și că boala recidivată prezintă rezistență la chimio- și/sau radioterapie a fost fundamentală în dezvoltarea unor regimuri terapeutice, chimioterapia în doze convenționale și/sau radioterapia, rămânând standardul de aur pentru tratamentul limfoamelor maligne. În formele de boală cu risc crescut, refractare sau recidivate, se pune problema completării arsenalului terapeutic cu imunoterapii.

Scopul enunțat, de evaluare retrospectivă a rezultatelor terapeutice la pacienții cu DLBCL, corelat și cu diverși parametrii clinico-biologici, imunohistochimici și moleculari, va fi urmărit printr-un studiu complex care a vizat pe de o parte parametrii clinici, pe de altă parte urmărindu-se efectul acestor parametrii asupra supraviețuirii pacienților diagnosticați cu această hematopatie.

Progresele științifice din ultimii ani din studiile neoplaziilor hematologice au pus pe tapet importanța evaluării studiului micromediului tumoral în limfoamele difuze cu celulă mare B în vederea stabilirii diagnosticului, dar și a prognosticului și tratamentului cu ajutorul testelor imunohistochimice și de biologie moleculară. Aplicarea acestor tehnici este deficitară, deoarece aceste teste sunt disponibile doar în centrele specializate.

Scopul acestei lucrări este de a cuantifica printr-o metodă automată componența micromediului tumoral și relevanța biologică a acestora în funcție de anumiți parametrii clinici și paraclinici pentru o calitate superioară a vieții cât și a unui răspuns mai bun la tratament.

Recunoașterea importanței micromediului tumoral reprezintă o piatră de temelie în vederea unor noi ținte și strategii terapeutice.

Micromediul tumoral prezintă de asemenea o heterogenicitate semnificativă în funcție de anumiți factori, inclusiv subtipul de limfom.

Direcțiile viitoare în tratamentul acestui tip de limfom sunt reprezentate de combinații optime, sinergice de agenți eficienți. Strategiile care includ terapii țintite asupra ciclului imunitate-cancer sunt imperioase.

Îmbunătățirea cunoașterii biologiei tumorale și rolul micromediului tumoral duce la obținerea unor diagnostice de calitate a unor clasificări, modele prognostice și a unor strategii terapeutice importante în curabilitatea pacienților diagnosticați cu limfom difuz cu celulă mare B. Studiile translaționale, dinamice care s-au corelat au dus la o mai bună înțelegere asupra importanței evaluării micromediului tumoral și interacțiunea acestuia cu noi ținte terapeutice în vederea curabilității acestei leziuni.

Studiul de față confirmă datele din literatură în ceea ce privește intersecția studiului datelor biologice cu aspectele clinice prin necesitatea urgentă a dezvoltării unor noi ținte terapeutice personalizate. Caracterizarea moleculară și celulară a diferitelor subtipuri de DLBCL a început să influențeze alegerile terapeutice, pavând o noua cale de dezvoltare terapeutică pentru aceste subtipuri.

Limfomul difuz cu celulă mare B este o boală heterogenă, atât clinic, cât și biologic. Conform datelor din literatură și multiplelor trialuri clinice se recomandă evaluarea standard a originii celulare, profilul genic (GEP) centru germinativ, respectiv non-centru germinativ, expresia imunohistochimică MYC și BCL 2, cât și rearanjamentele MYC, BCL2 și BCL 6. Expresia duală MYC/BCL2 conform studiului de față, cât și a studiilor din literatură necesită o atenție deosebită, deoarece acești pacienți prezintă un prognostic prost, ar trebui să fie candidați pentru diferite trialuri clinice și necesită un tratament intens.

În concluzie, studiul de față, scoate în evidență că evaluarea celulelor tumorale cât și evaluarea celulelor din micromediul tumoral reprezintă un aspect mult mai puternic decât factorii izolați

Limfomul difuz cu celulă mare B este o limfoproliferare monoclonală care prezintă o heterogenicitate marcată din punct de vedere clinic și biologic. Deși limfomul difuz cu celulă mare B poate să apară la orice vârstă, cel mai frecvent apare la adulții vârstnici sau la vârsta medie. Majoritatea pacienților au fost diagnosticați în a șaptea - a opta decadă de viață cu o medie a vârstei de 63 de ani, însă unele studii prezintă o creștere dramatică după vârsta de 50 de ani.

Este necesară o clasificare precisă a limfoamelor deoarece există subtipuri numeroase de limfoame, nu toate limfoamele prezintă aceleași aspecte clinice sau comportament prognostic, strategiile terapeutice depinzând de subtipul histologic și nu în ultimul rând este esențială în studiul etiologiei, epidemiologiei, patogenezei și a factorilor de risc.

Limfomul cu celulă mare B difuz se caracterizează prin rearanjamente clonale de imunoglobuline cu lanțuri grele și ușoare de gene. În anumite cazuri există hipermutații somatice. În funcție de profilul expresiei genetice (GEP) se identifică două grupuri biologice distincte conform originii celulare: subtip centru germinativ (GCB) și subtip cu celulă activată (ABC). Conform acestui tip de clasificare există un subgrup mic care nu este clasificat în aceste două entități.

Pacienții cu subtip ABC prezintă un risc mai mare de a nu răspunde la terapiile moderne, devenind un subtip încadrat ca grup de risc avansat chiar în era rituximab, cu semnificație clinică necunoscută, însă cu răspuns bun la noile strategii terapeutice (bortezomib, lenalidomidă sau ibrutinib).

Conform noilor modificări aduse de extensia OMS 2016, algoritmul Hans rămâne cel mai popular sistem cu cele mai rezonabile corelații cu GEP, însă este permisă și folosirea altor algoritmi. Pentru cele 10-15% dintre cazurile GEP neclasificabile se utilizează cuantificarea transcripției de ARN din țesuturile incluse la parafină cu impact prognostic în clasificare în funcție de celula de origine.

Înțelegerea heterogenității moleculare a limfomului difuz cu celulă mare B poate ajuta pacienții în vederea unor tratamente țintite în ceea ce privește aspectele moleculare și genetice specifice fiecărui individ în parte.

Pentru a stabili terapia pacienților diagnosticați cu DLBCL, este necesară cunoașterea și aplicarea ghidurilor clinice internaționale European Society of Medical Oncology (ESMO) și National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

Acest micromediu este un sistem dinamic fiind în mare parte orchestrat de celulele inflamatorii care includ celule tumorale, țesutul stromal (celule imune, fibroblaste, citokine și microvascularizație), precum și matrice extracelulară înconjurătoare. Perturbările de la nivelul acestei rețele cresc potențialul diviziunii cronice a celulelor B ca într-un final, să influențeze limfomogeneza. Aceste perturbări pot fi modulate de anumite citokine.

Recunoașterea importanței micromediului tumoral a pavat drumul dezvoltării unor noi strategii terapeutice care țintesc micromediul și interacțiunile acestuia cu celulele neoplazice.

Compoziția celulară și spațiul caracteristic micromediului tumoral este heterogenă în funcție de un anumit număr de factori, inclusiv subtipul limfomului.

Contribuția micromediului tumoral în patogeneză și supraviețuirea tumorală în DLBCL este foarte puțin înțeleasă deși unele studii recente au demonstrat niște aspecte intrigante asupra rolului micromediului tumoral.

Foarte multe studii au evaluat rolul PD-1 și PDL-1 care se exprimă în majoritatea limfoamelor B agresive, dar care se corelează de asemenea cu mecanisme de evadare imună.

Calea ce constă în receptorul PD-1 (CD 279) și a liganzilor acestuia PDL-1 și PDL-2 (B7-DC; CD 273) joacă un rol esențial în toleranța periferică și de asemenea mediază semnale inhibitoare care alcătuiesc imunitatea antitumorală. Calea țintă PD-1/PDL-1 prezintă eficiența clinică în tumorile solide dar de asemenea în limfomul Hodgkin și non-Hodgkin.

Densitatea microvascularizației (MVD) evaluează neovascularizația în limfoame care este generată ca răspuns la celulele tumorale, celule stromale proangiogenice, limfocitele T/B non-neoplazice și celulele mieloide de la nivelul micromediului tumoral. MVD variază foarte mult în funcție de anumite studii datorită heterogenității stromei,

gama de markeri imunohistochimici folosiți și metodele diferite de scorificare. În general scorurile MVD sunt crescute în limfoamele agresive incluzând limfomul Burkitt și limfom primar cutanat T, în DLBCL fiind intermediar și scăzut în limfoamele indolente. În DLBCL există date diferite în ceea ce privește corelația dintre MVD și expresia VEGF. Gratzinger et al. a raportat într-un studiu pe 95 de pacienți, un spectru larg în ceea ce privește heterogenitatea bolii, deși media MVD s-a corelat intens cu VEGF. Un alt studiu pe 182 de pacienți diagnosticați cu DLBCL de novo tratați cu antraciclină-chimioterapie nu a relevat concordanță între MVD crescută și expresia VEGF în celule tumorale. Toți investigatorii au concluzionat că vascularizația crescută intratumorală s-a asociat cu un prognostic prost și este un factor independent de scorul Index Internațional de prognostic.

Scopul lucrării și justificarea studiului

Limfomul difuz cu celulă mare B reprezintă cel mai frecvent limfom malign non Hodgkin, ce depășește 35% din totalul acestora din urmă și peste 85% din totalul LMNH agresive. Reprezintă o problemă de sănătate națională și internațională deoarece apare la toate vârstele și fără semne și simptome specifice.

Teza are ca principal scop analiza retrospectivă și evaluarea micromediului tumoral, studiat prin teste imunohistochimice în concordanță cu parametrii clinico-biologici cu răsunet prognostic. Parametrii clinico-biologici au fost vârsta, sexul, stadiul Ann Arbor, Scorul IPI, statusul de performanță ECOG, tipul de răspuns terapeutic, apariția recăderii, durata răspunsului la terapia, tipul de boală, însă o atenție deosebită este acordată și bolii voluminoase.

Recunoașterea importanței micromediului tumoral în special în malignitățile de tip B, a pavat noi orizonturi de dezvoltare a unor strategii terapeutice țintite asupra acestuia, cât și asupra interacțiunii cu celulele tumorale.

Este esențială o identificare personalizată a principalilor factori de prognostic și coroborarea acestora cu trialurile clinice actuale în vederea îmbunătățirii calității vieții și a supraviețuirii.

Studiul de față își propune identificarea și cuantificarea principalilor factori de prognostic clinici și imunohistochimici care au influențat tipul de răspuns terapeutic, evoluția și supraviețuirea pacienților cu limfom difuz cu celulă mare B.

Principalele obiective au fost determinarea principalilor parametrii clinico-biologici și efectul acestora asupra: reducerii masei tumorale după prima cură de chimioterapie, tipului de răspuns la tratament: complet, parțial, non-responsiv, apariției recăderii, duratei de răspuns la tratament, statusului de performanță ECOG, stadiului Ann Arbor, scorului IPI, tipului de boală: voluminoasă și non-voluminoasă, valorii serice a LDH după prima cură terapeutică, prezenței hepato și sponomaegaliei, prezenței infiltratului medular.

Material și metodologia cercetării

Am realizat un studiu retrospectiv desfășurat pe o perioadă de 5 ani, incluzând 80 de pacienți tratați în cadrul Secției de Hematologie a Spitalului Clinic Colțea București. Studiul histopatologic și imunohistochimic au fost efectuate în Departamentul de Anatomie Patologică din cadrul Spitalului Clinic Colțea și a Spitalului Universitar de Urgență București.

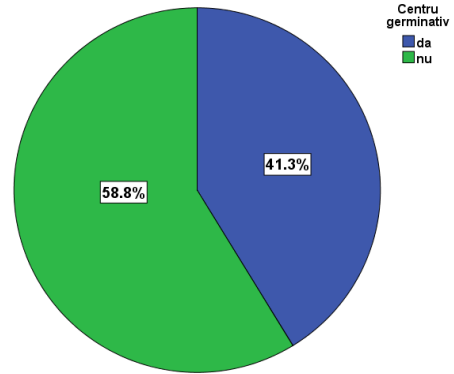
Pentru analiza univariată au fost folosite testele Likelihood Ratio sau Fisher exact, Mann-Whitney pentru a compara variabilele continue și discontinue. Analiza supraviețuirii a fost efectuată cu metoda Kaplan-Meier comparată cu testul log-rank. Următorii parametri au fost analizați : vârsta la diagnostic, sexul, localizarea tumorală, indexul de proliferare mitotică, evaluarea micromediului tumoral, subtipul de limfom, tipul de celulă și date personale patologice în care sunt incluse tipul de răspuns la tratament, antecedente personale patologice, stadiul bolii, statusul de performanță, stadiul IPI. Valoarea $p < 0,05$ a fost interpretată ca semnificativ statistic. Analizele au fost efectuate cu softurile R și STATISTICĂ.

Pentru studiul imunohistochimic al pieselor incluse în parafină am realizat blocuri multitisulare.

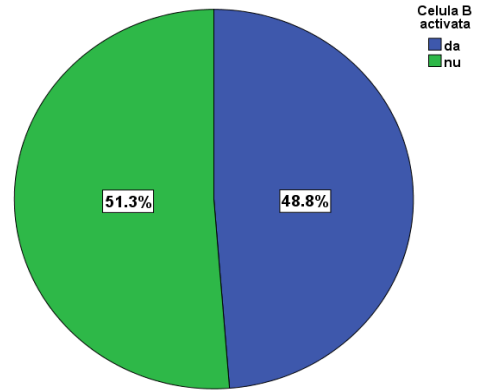
Rezultate

Distribuția pacienților conform algoritmului Hans

Centru germinativ	Frequency (Nr)	Percent (%)
Valid da	33	41.3
Valid nu	47	58.8
Total	80	100.0



Celula B activată	Frequency (Nr)	Percent (%)
Valid da	39	48.8
Valid nu	41	51.3
Total	80	100.0



Clasificarea limfomului difuz cu celulă mare B, conform algoritmului Hans a fost reprezentată de 33 de pacienți diagnosticați cu centru germinativ și 39 cu celulă activată/non-centru germinativ.

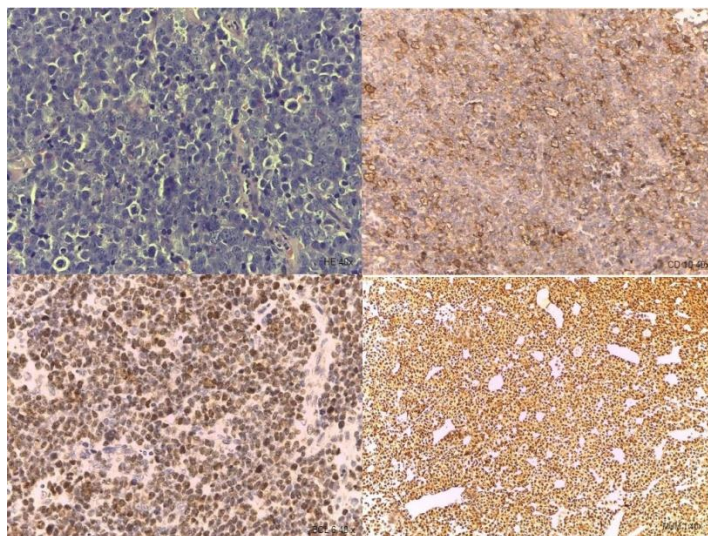
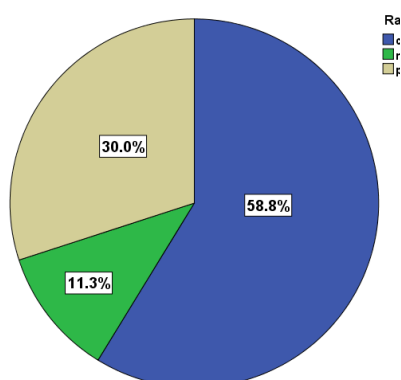


Fig 1. Hematoxină-eozină 40x, proliferare difuză de celule de talie mare cu nuclei tahicromi si citoplasmă amfofilă abundentă. Fig 2. CD 10 pozitiv în peste 30% din celule tumorale. Fig 3. BCL6 40x pozitiv nuclear în peste 30% din nucleii celulelor tumorale Fig 4. MUM 1 40X pozitiv în peste 30% nucleii celulelor tumorale.

Distribuția pacienților în funcție de răspunsul la tratament

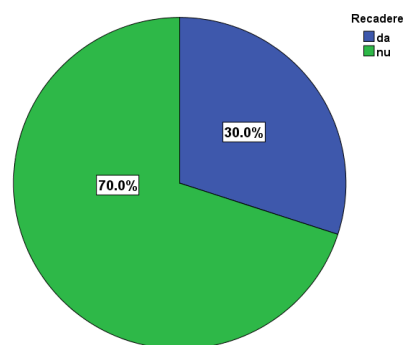
Răspunsul terapeutic complet a fost înregistrat la 47 de pacienți, reprezentând cu puțin peste jumătate (58,8%), în timp ce 24 au prezentat răspuns parțial, restul de 11,3 % au fost non-responsivi.



Distribuția pacienților în funcție de recădere

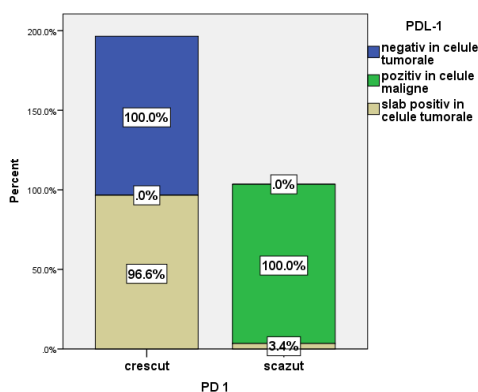
Recăderea a fost înregistrată la 24 din pacienți reprezentând 30%, restul, aproximativ trei sferturi, respectiv 56 de pacienți, nu au prezentat recădere.

Recădere	Frequency	Percent
da	24	30.0
nu	56	70.0
Total	80	100.0



Distribuția pacienților în funcție de concordanța între PDL-1 VS PD-1

Corelarea între gradele PD-1 și PDL-1 este semnificativ statistic în ceea ce privește nivelul crescut PD-1 cu negativitatea PDL-1 în proporție de 100%. Pacienții care au prezentat PD-1 crescut s-au asociat în proporții de 100%, respectiv 96,6% cu PDL-1 negativ, respectiv slab pozitiv. PD-1 scăzut s-a asociat în porție de 100% cu PDL-1 negativ.

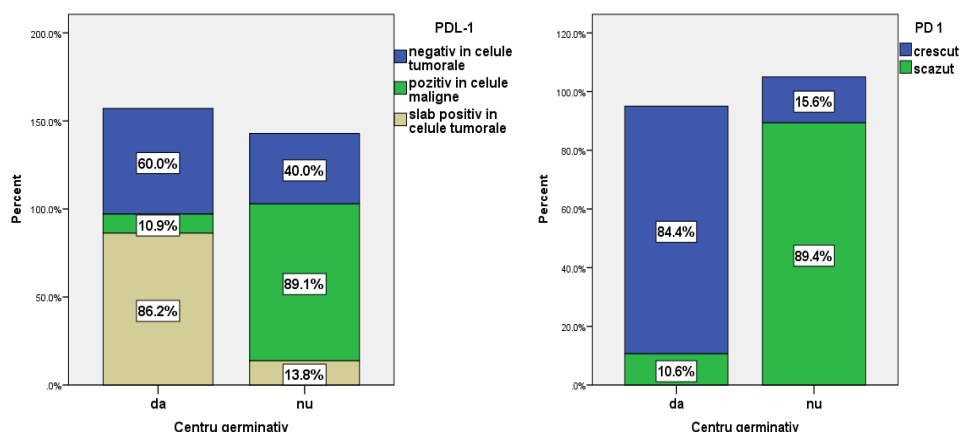


Asociere pe grupe de distribuție PDL-1 vs PD-1 cu profilul genic (GEP) conform Algoritmului Hans

Profilul genic conform algoritmului Hans și coroborea acestuia cu distribuția PD-1 respectiv PDL-1 este următoarea:

Centru germinativ se asociază în proporție crescută de 60% cu negativitatea PDL-1 în celule tumorale și în proporție de 86,2%, respectiv 10,9% cu pozitivitatea slabă și intensă în celule tumorale.

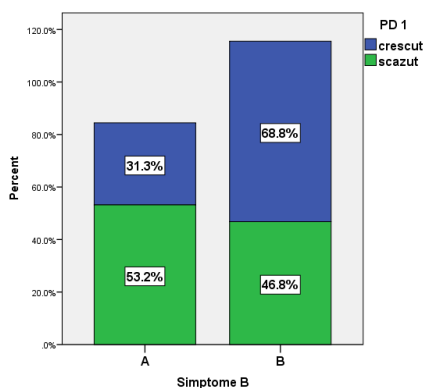
Profilul genic non-centru germinativ sau celulă activată se asociază într-un procent de 89,1%, respectiv 13,8% cu pozitivitatea intensă și slabă a PDL-1 în celule tumorale și într-o proporție mai mică de 40% cu negativitatea PDL-1.



Profilul genic de tip centru-germinativ se asociază într-un procent de 84,4% cu un procent crescut al PD-1 în celulele imune, în timp ce PD-1 scăzut în celulele imune se asociază într-un procent mai mic de 10,6% cu centru germinativ.

DLBCL de tip non-centru germinativ se asociază în procent de 89,4% pozitivitate scăzut pentru PD-1 și într-un procent de 15,6% pozitivitate crescută în celulele imune.

O asocierea semnificativ statistică a fost între procentul de celule tumorale pozitive și slab pozitive în proporție de 75,9%, respectiv 64,4% și localizarea extraganglionară, în timp ce pacienții care nu au prezentat localizare extraganglionară au prezentat în proporție de 80% PDL-1 negativ în celulele tumorale.



Așa cum reiese din analiza lotului studiat, o altă asocierea semnificativ statistică a fost între parametrii clinici și imunohistochimici după cum urmează, absența simptomelor B se corelează cu prezența scăzută PD-1 în celulele imune din micromediul tumoral, în timp ce pacienții care au prezentat simptome B au prezentat PD-1 crescut.

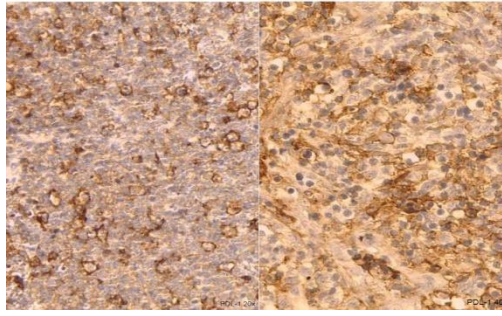


Fig 5. PDL-1 20x pozitiv în peste 10% din celulele tumorale Fig 6. PDL-1 40x pozitiv în peste 10% din celule tumorale.

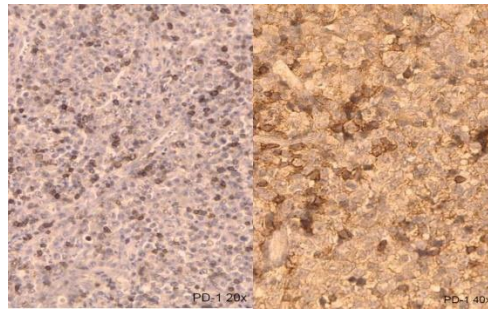
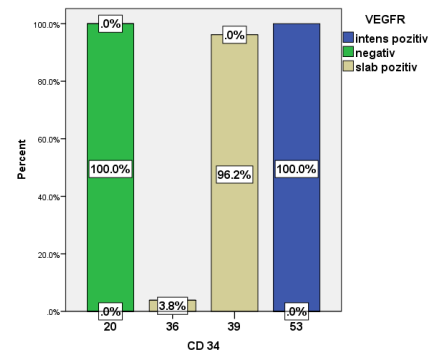
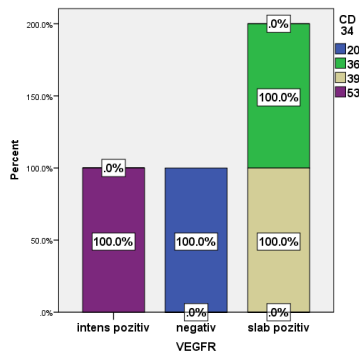


Fig 7. PD-1 20x pozitiv în peste 10% din limfocite din micromediul tumoral. Fig 8. PD-1 40x pozitiv în peste 10% din limfocite din micromediul tumoral.

Distribuția pacienților în funcție de concordanța asocierii CD 34 și VEGFR

Corelarea între gradele de intensitate exprimate de VEGFR cu intensitatea microvascularizației cuantificate cu ajutorul CD 34 a fost semnificativ statistică. Pacienții care au prezentat pozitivitate intensă VEGFR s-au corelat cu o vascularizație crescută cuantificată CD 34, în timp ce pacienții care au avut pozitivitate slabă VEGFR au prezentat microvascularizație intermediară, iar pacienții VEGFR negativi au prezentat vascularizație scăzută.

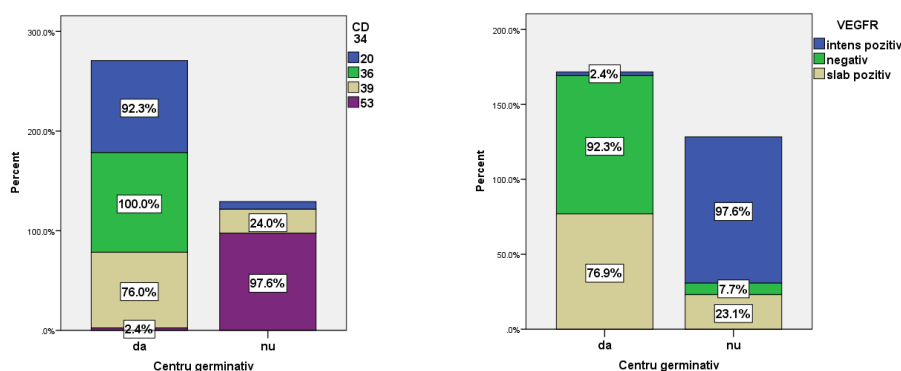


Test: Pearson Chi-Square, p_value=0.000000

Asocierea CD 34 respectiv VEGFR cu subtipul DLBCL conform algoritmului Hans.

Conform algoritmului Hans profilul genic de tip centru germinativ s-a asociat în proporție de 92,3% cu microvascularizație scăzută evaluată cu ajutorul CD 34, 76% de pacienții care au prezentat o microvascularizație intermediară (CD 34 36-39 vase sanguine), iar cea mai mică proporție de 2,4% sunt reprezentați de microvascularizația crescută.

Profilul genic non-centru germinativ s-a asociat în proporție de 97,6% cu o microvascularizație crescută (CD 34 – 53 vase sanguine) cei mai puțini se asociază cu microvascularizație scăzută și intermediară.



Concordanța dintre profilul genic și VEGFR a fost următoarea:

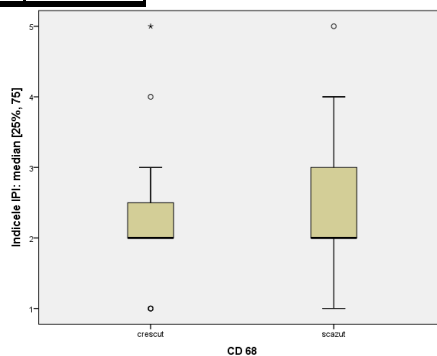
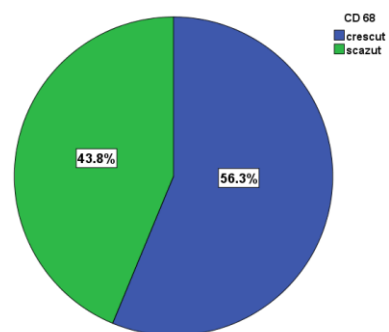
Profilului genic de tip centru germinativ s-a asociat în cea mai mare măsură (92,3%) cu VEGFR negativ, urmat de VEGFR slab pozitiv (76,9%) în timp ce VEGFR intens pozitiv s-a asociat cu DLBCL de tip centru germinativ într-un procent de 2,4%.

Profilul genic non-centru germinativ/celulă activată s-a asociat în proporție de 97,6% cu VEGFR intens pozitiv, urmat într-un procent de 23,1% de VEGFR slab pozitiv și într-un procent de 7,1% de VEGFR negativ.

14. Distribuția pacienților în funcție de prezența macrofagelor tip M1 CD 68 pozitive în micromediul tumoral

Prezența macrofagelor CD68 în micromediul tumoral a fost prezentă în procent crescut la 56,3% dintre pacienți, în timp ce valorile scazute ale CD 68 au fost prezente la 43,2%.

CD 68	Frequency	Percent
crescut	45	56.3
Valid scăzut	35	43.8
Total	80	100.0



Asocierea dintre procentul macrofagelor de tip M1 CD 68 pozitive și indicele IPI, relevă următoarele date cu semnificație statistică: prezența crescută a macrofagelor de tip M1 CD 68 pozitive se corelează într-un procent de 57,1% cu scor IPI – risc scăzut, în timp ce nivelul scăzut de macrofage CD 68 pozitive se asociază într-un procent crescut (66,7%) cu riscul crescut conform scorului IPI.

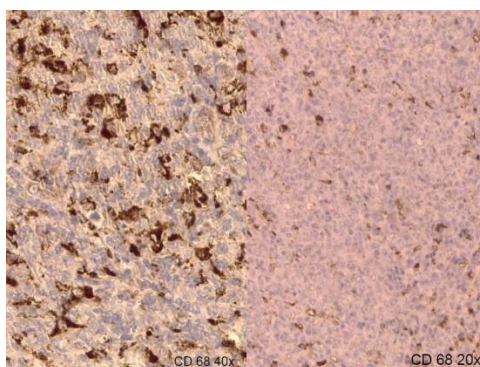


Fig 9/ Fig 10 CD 68 40 x/20x pozitiv în macrofage de tip M1 din micromediul tumoral.

CD 68 * Statutul de performanță clinică (ECOG)	Statutul de performanță clinică (ECOG)			Total
	2	3	4	
Count	30 _a	14 _a	1 _a	45
crescut % within Statutul de performanță clinică (ECOG)	58.8%	51.9%	50.0%	56.3%
Count	21 _a	13 _a	1 _a	35
scăzut % within Statutul de performanță clinică (ECOG)	41.2%	48.1%	50.0%	43.8%
Count	51	27	2	80
% within Statutul de performanță clinică (ECOG)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

În urma coroborării macrofagelor de tip CD68 pozitive pe lotul studiat se observă o asociere între prezența unui număr crescut de macrofage CD 68 în micromediul tumoral și statusul de performanță clinică ECOG 2 scăzut și o asociere între statusul de performanță clinică ECOG 4 și numărul scăzut de macrofage de tip M1 CD 68 pozitive.

Centru germinativ * CD 68	CD 68		Total
	crescut	scazut	
Count da	23 _a	10 _b	33
% within CD 68	51.1%	28.6%	41.3%
Count nu	22 _a	25 _b	47
% within CD 68	48.9%	71.4%	58.8%
Count	45	35	80
% within CD 68	100.0%	100.0%	100.0%

Test: Pearson Chi-Square, p_value=**0.042199**

Profilul genic de tip centru germinativ se asociază în proporție de 51,1% cu nivelul crescut de macrofage de tip M1 CD 68 pozitive, în timp ce GEP non-centru germinativ se asociază într-o proporție de 71,4% cu nivelul scăzut de macrofage de tip M1 CD 68 pozitive în micromediul tumoral.

Distribuția pacienților în funcție de pozitivitatea MYC și BCL2

Din totalul de pacienți din lotul studiat 6 au prezentat pozitivitate duală pentru MYC și BCL2.

MYC_BCL2	Frequency	Percent
altfel	74	92.5
Valid da	6	7.5
Total	80	100.0

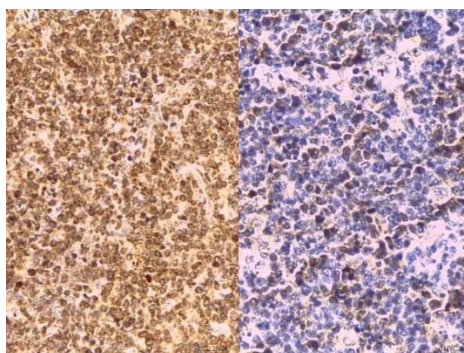
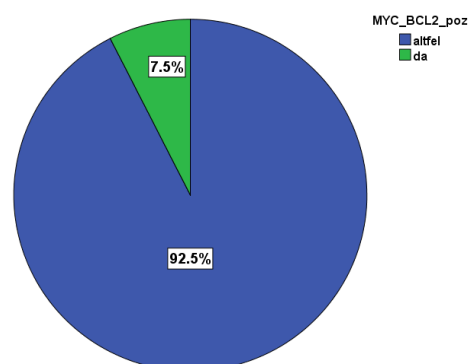
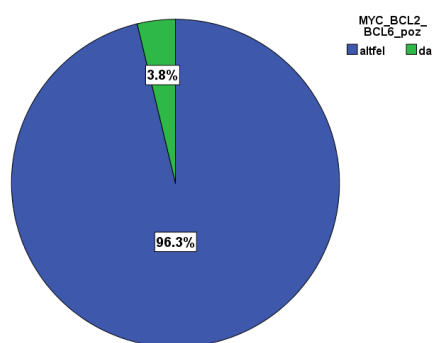


Fig 11. BCL 2 40 x pozitiv în peste 50% din celule tumorale. Fig. 12 c-Myc 40x pozitiv în peste 50% din celule tumorale.

Distribuția pacienților în funcție de pozitivitatea MYC, BCL6 și BCL2

Din totalul de pacienți din lotul studiat 3 au prezentat pozitivitate duală pentru MYC, BCL6 și BCL2.

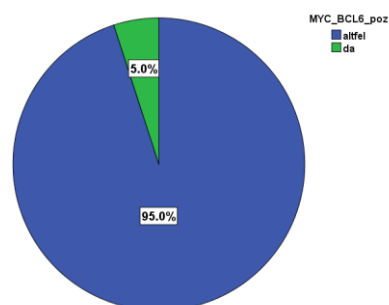
MYC/BCL2/ BCL6	Frequency	Percent
altfel	77	96.3
Valid da	3	3.8
Total	80	100.0



Distribuția pacienților în funcție de pozitivitatea MYC și BCL6

Pacienții care au prezentat pozitivitate duală MYC și BCL 6 din totalul de pacienții din lotul studiat au fost în procent scăzut de 5% (4 pacienți).

MYC/BCL6	Frequency	Percent
altfel	76	95.0
Valid da	4	5.0
Total	80	100.0



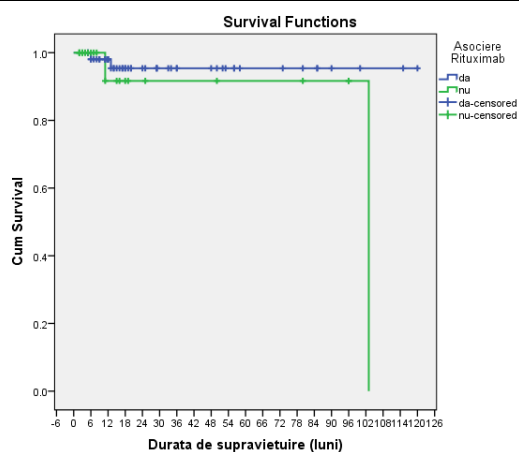
Durata de supraviețuire în funcție de asocierea cu Rituximab

Din totalul de pacienți din lotul studiat 55 au avut asociat Rituximab tratamentului chimioterapic, înregistrându-se 2 decese.

Media timpului de supraviețuire estimată până la deces este **95,333 luni**, iar mediana timpului de supraviețuire (timpul pentru care la 50% dintre subiecți apare evenimentul) este de 103 luni.

Asociere Rituximab	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supravietuitori)	
			N	Percent
da	55	2	53	96.4%
nu	25	2	23	92.0%
Overall	80	4	76	95.0%

Asociere Rituximab	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
da	114.930	3.532	108.007	121.852
nu	95.333	10.381	74.987	115.680	103.000	.000	.	.
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347



Pentru pacienții cu tratament chimioterapic asociat cu Rituximab se observă o tendință de ameliorare a supraviețuirii, dar fără semnificație statistică certă.

Durata de supraviețuire în funcție de profilul genic (GEP) conform algoritmului lui Hans

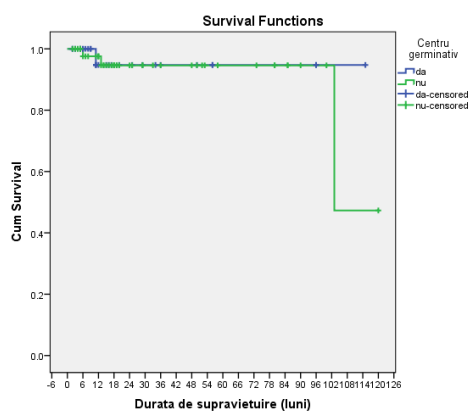
Din totalul pacienților incluși în studiu, 33 au fost subclasificați ca limfom difuz cu celulă mare B tip centru germinativ, dintre care 1 a decedat. Restul, de 47 de pacienți au fost subclasificați ca limfom difuz cu celulă mare B non-centru germinativ/celulă activată. Din totalul pacienților cu celulă activată, 3 au prezentat eveniment de deces. Comparând supraviețuirea pe cele două loturi nu se obține diferență semnificativă.

Centru germinativ	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
da	33	1	32	97.0%
nu	47	3	44	93.6%
Overall	80	4	76	95.0%

1.

Supraviețuitori	6 luni	12 luni	18 luni	24 luni	36 luni	48 luni	60 luni
Centru germinativ=da	100%	94.7%	94.7%	94.7%	94.7%	94.7%	94.7%
Centru germinativ=nu	97.6%	97.6%	94.6%	94.6%	94.6%	94.6%	94.6%

2.



Media timpului de supraviețuire estimată până la deces pentru cei cu centru germinativ a fost de 109,526 luni cu o deviație standard de 5,328 luni, în timp ce pentru cei

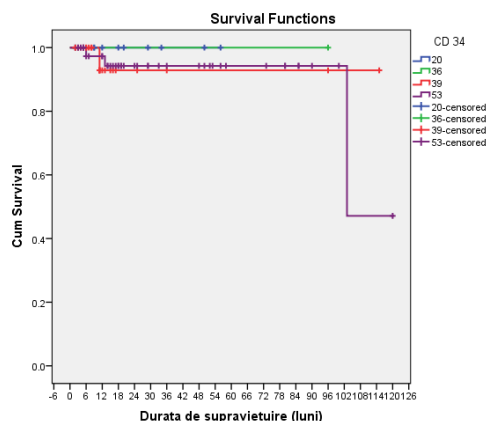
cu celulă activată a fost de 106,015 luni. Mediana timpului de supraviețuire calculată pentru pacienții non-centru germinativ a fost de 103 luni.

Centru germinativ	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
da	109.526	5.328	99.084	119.969
nu	106.015	6.830	92.627	119.402	103.000	.	.	.
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

Durata de supraviețuire conform asocierii CD 34 și VEGFR

Din totalul pacienților incluși în studiu, cei mai mulți, 41 au prezentat microvascularizație crescută la nivelul micromediului tumoral cuantificată CD 34, 25 dintre aceștia au prezentat vascularizație medie, iar 13 pacienți au prezentat o vascularizație scăzută. Cele mai multe decese (3) s-au înregistrat la pacienții care au prezentat vascularizație crescută, la pacienții care au prezentat vascularizație intermediară înregistrându-se un singur deced.

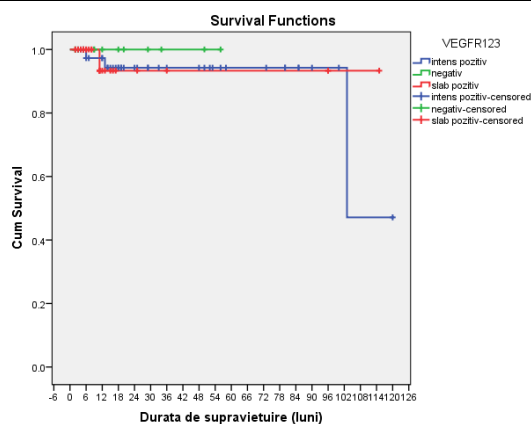
CD 34	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
20	13	0	13	100.0%
36	1	0	1	100.0%
39	25	1	24	96.0%
53	41	3	38	92.7%
Overall	80	4	76	95.0%



Din analiza curbelor de supraviețuire la pacienți evaluați pentru statusul microvascularizației (prin evaluarea CD 34) se observă o tendință de scădere a supraviețuirii la pacienții cu CD 34 peste 39 de vase față de cei sub 36 de vase prezente.

Pacienții care au prezentat pozitivitate intensă VEGFR au prezentat de asemenea o scădere a supraviețuirii în primele 12 luni de 97,3%, urmând ca aceasta să scadă după această perioadă. O scădere a supraviețuirii se remarcă de asemenea și la pacienții cu VEGFR slab pozitiv după primele 6 luni de la diagnostic.

VEGFR123	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
intens pozitiv	41	3	38	92.7%
negativ	13	0	13	100.0%
slab pozitiv	26	1	25	96.2%
Overall	80	4	76	95.0%

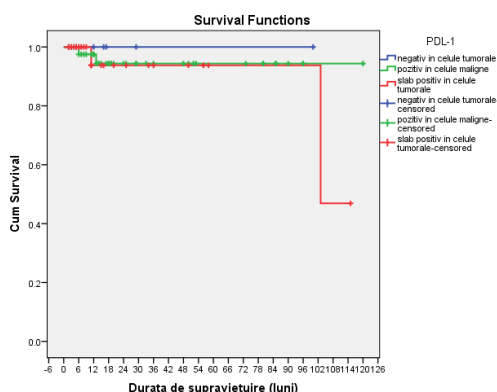


Din analiza curbelor de supraviețuire la pacienți evaluați pentru statusul microvascularizatiei (prin evaluarea VEGFR) se observă o tendință de scădere a supraviețuirii la pacienții VEGFR intens pozitiv.

Durata de supraviețuire conform asocierii PDL-1/PD-1

Evaluarea PDL-1 la pacienții din lotul studiat a fost următoarea, majoritatea pacienților 46, au prezentat pozitivitate PDL-1 în celule tumorale, în timp ce 29 dintre aceștia au prezentat pozitivitate PDL-1 slabă în celule tumorale cu număr de decese egal între aceste variabile. 5 pacienți au prezentat negativitate PDL-1 în celule tumorale.

PDL-1	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
negativ	5	0	5	100.0%
pozitiv	46	2	44	95.7%
slab pozitiv	29	2	27	93.1%
Overall	80	4	76	95.0%



Analizând curbele de supraviețuire se observă o tendință de scădere a supraviețuirii la pacienții cu pozitivitate PDL-1 intensă și slabă în celule tumorale.

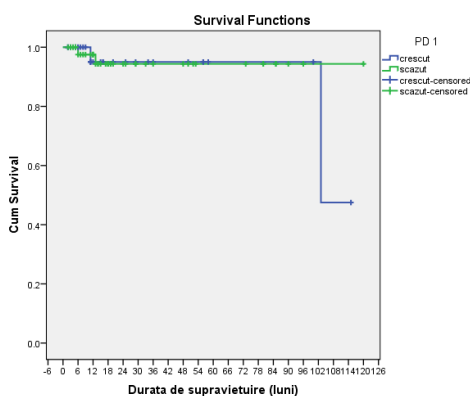
Din totalul de pacienți din lotul studiat, 47 dintre aceștia au prezentat pozitivitate scăzută PD-1 în limfocite T din micromediul tumoral și 2 dintre aceștia au prezentat eveniment de deces. Restul de 32 au prezentat pozitivitate crescută PD-1 în limfocite T din micromediul tumoral.

PD 1	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
crescut	32	2	30	93.8%
scăzut	47	2	45	95.7%
Overall	79	4	75	94.9%

PD 1	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
crescut	104.100	6.249	91.851	116.349	103.000	.	.	.
scăzut	113.785	4.290	105.376	122.194
Overall	108.687	5.416	98.072	119.303

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

Media de supraviețuire până la deces pentru lotul de pacienți cu PD-1 crescut în limfocite din micromediul tumoral a fost 104,100 cu o deviație standard de 6, 249 luni, în timp ce mediana de supraviețuire a fost 103,00 luni. Supraviețuirea pacienților în primele 6 luni a fost de 97,5% pentru prezența unui raport scăzut PD-1 în micromediul tumoral.



În urma analizei supraviețuirii se constată o tendință de scădere a supraviețuirii în primele 12 luni la pacienții cu pozitivitate crescută PD-1 în limfocite din micromediul tumoral.

Durata de supraviețuire asociat cu prezența macrofagelor tip M1 CD 68 pozitiv în micromediul tumoral

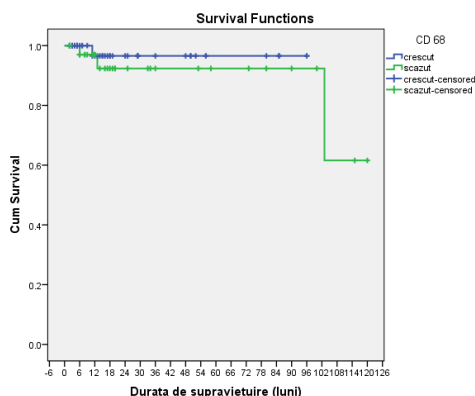
Din totalul de pacienți din lotul studiat, 45 dintre aceștia au prezentat pozitivitate CD 68 și înregistrându-se un singur deces, iar 35 au prezentat un număr scăzut de macrofage M1 în micromediul tumoral, înregistrându-se 3 decese în rândul acestora.

CD 68	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
crescut	45	1	44	97.8%
scăzut	35	3	32	91.4%
Overall	80	4	76	95.0%

CD 68	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
crescut	93.069	2.880	87.424	98.714
scăzut	106.371	6.975	92.700	120.042
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

Media de supraviețuire a a pacienților cu procent crescut CD 68 a fost 93,069 luni cu o eroare standard de 2,880 luni, în timp ce la pacienții cu nivel scăzut CD 68 a fost de 106,371 luni cu o eroare standard de 6,975 luni. În urma analizei curbelor de supraviețuire,

se constată o scădere a supraviețuirii de 97% în primele 12 luni pentru procentul scăzut de macrofage de tip M1 Cd 68.



Analizând curbele de supraviețuire se observă o tendință de scădere a supraviețuirii în primele 12 luni la pacienții care au prezentat un număr scăzut de macrofage de tip M1 CD 68 pozitive.

Durata de supraviețuire în funcție de asocierea pozitivității MYC și BCL2

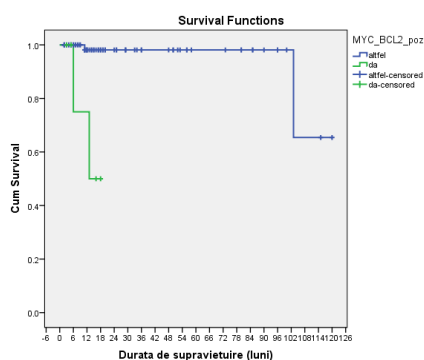
Din totalul de pacienți din lotul studiat 6 au prezentat pozitivitate MYC și BCL 2 dintre aceștia înregistrându-se 2 decese. Media de supraviețuire până la deces a fost de 13,750 luni cu mediana de supraviețuire a fost de 13,00 luni.

MYC/BCL2	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
altfel	74	2	72	97.3%
da	6	2	4	66.7%
Overall	80	4	76	95.0%

MYC/ BCL2	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
altfel	112.384	4.933	102.715	122.053
da	13.750	2.459	8.930	18.570	13.000	.	.	.
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

	Chi-Square	df	Sig. (p_value)
Log Rank (Mantel-Cox)	19.832	1	0.000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	19.683	1	0.000

Analiza curbelor de supraviețuire în ceea ce privește pacienții cu pozitivitate duală MYC și BCL 2 se observă o tendință de scădere a supraviețuirii în primele 18 luni.



Durata de supraviețuire în funcție de asocierea pozitivității MYC și BCL2

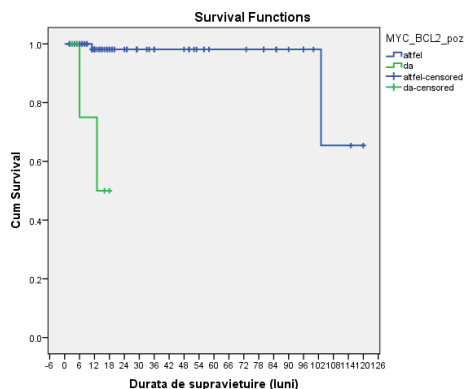
Din totalul de pacienți din lotul studiat 6 au prezentat pozitivitate MYC și BCL 2 dintre aceștia înregistrându-se 2 decese. Media de supraviețuire până la deces a fost de 13,750 luni cu mediana de supraviețuire a fost de 13,00 luni.

MYC/BCL2	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
altfel	74	2	72	97.3%
da	6	2	4	66.7%
Overall	80	4	76	95.0%

MYC/ BCL2	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
altfel	112.384	4.933	102.715	122.053
da	13.750	2.459	8.930	18.570	13.000	.	.	.
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

	Chi-Square	df	Sig. (p_value)
Log Rank (Mantel-Cox)	19.832	1	0.000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	19.683	1	0.000

Analiza curbelor de supraviețuire în ceea ce privește pacienții cu pozitivitate duală MYC și BCL 2 se observă o tendință de scădere a supraviețuirii în primele 18 luni.



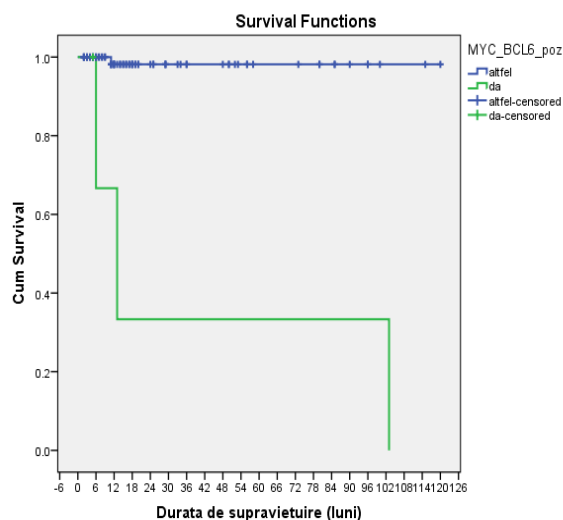
Durata de supraviețuire în funcție de asocierea pozitivității MYC și BCL6

Din totalul pacienților din lotul studiat, 4 au prezentat pozitivitate MYC și BCL 6 înregistrându-se 3 decese în cadrul acestora. Media de supraviețuire până la deces a pacienților cu pozitivitate MYC/BCL 6 este de 40,667 luni cu o deviație standard de 2 luni, iar mediana de supraviețuire este de 13 luni.

MYC/BCL6	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
altfel	76	1	75	98.7%
da	4	3	1	25.0%
Overall	80	4	76	95.0%

MYC/BCL6	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
			altfel	117.981			2.000	114.062
da	40.667	31.232	.000	101.882	13.000	5.715	1.798	24.202
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

	Chi-Square	df	Sig. (p_value)
Log Rank (Mantel-Cox)	18.975	1	0.000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	29.985	1	0.000



Analizând curbele de supraviețuire se constată o tendință de scăderea a supraviețuirii în primele 12 luni la pacienții cu pozitivitate MYC/BCL6, menținând o curbă a supraviețuirii scăzută și după primul an.

Durata de supraviețuire și asocierea pozitivității MYC, BCL6 și BCL2

Din totalul de pacienți din lotul de studiu, 3 au prezentat triplă pozitivitate MYC/BCL2/BCL6 dintre care 2 au decedat.

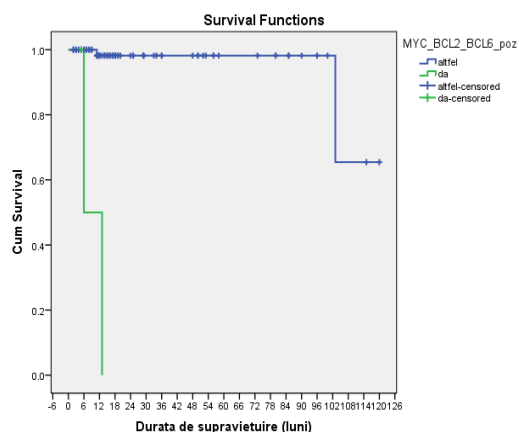
Media de supraviețuire estimată până la deces pentru pacienții care au prezentat pozitivitate MYC/BCL2/BCL6 a fost de 9,500 luni cu o deviație standard de 4,909 luni, iar mediana de supraviețuire a fost de 6,000 luni.

MYC/BCL2/BCL6	Total N	N of Events (Decese)	Censored (Supraviețuitori)	
			N	Percent
altfel	77	2	75	97.4%
da	3	2	1	33.3%
Overall	80	4	76	95.0%

MYC/BCL2/ BCL6	Mean ^a				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
altfel	112.455	4.909	102.832	122.077
da	9.500	3.500	2.640	16.360	6.000	.	.	.
Overall	108.789	5.387	98.232	119.347

Comparând supraviețuirea pe cele 2 loturi se obține o **diferență semnificativă din punct de vedere statistic** (test pt cele 2 curbe: p_value= **0.000**, Log Rank (Mantel-Cox)).

	Chi-Square	df	Sig. (p_value)
Log Rank (Mantel-Cox)	55.015	1	0.000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	51.882	1	0.000



Analizând curbele de supraviețuire se constată o scăderea a supraviețuirii în primele 12 luni a pacienților cu pozitivitate triplă MYC/BCL2/BCL6.

Răspunsul la tratament în funcție de asocierea cu Rituximab

Pacienții care au prezentat asociat Rituximab la cura chimioterapică au prezentat răspuns complet și parțial în proporție de 70,2%, respectiv 62,5% în timp ce pacienții care nu au prezentat asociat Rituximab au avut răspuns complet, respectiv parțial într-un procent mic de 29,8%, respectiv 37,5%. Numărul mic de pacienți non-responsivi în asociere sau fără Rituximab nu au prezentat semnificație statistică din cauza numărului scăzut luat în studiu.

Asociere Rituximab		Răspuns			Total	
		complet	parțial	nonresponsiv		
Asociere Rituximab	da	Count	33 _a	15 _a	5 _a	53
		% within Răspuns	70.2%	62.5%	83.3%	68.8%
	nu	Count	14 _a	9 _a	1 _a	24
		% within Răspuns	29.8%	37.5%	16.7%	31.2%
Total		Count	47	24	6	77
		% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

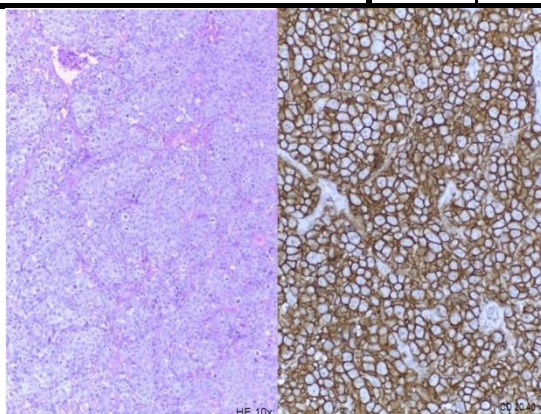


Fig. 13 Hematoxină-eozină 10 x, proliferare difuză de celule mari atipice, cu nuclei rotund-ovalari, ocazional neregulați, nucleoli proeminenți și citoplasmă puțină amfofilă.

Fig 14. CD 20 40x pozitiv membranar în celule tumorale.

Răspunsul la tratament în funcție de profilul genic (GEP) conform algoritmului lui Hans

Pacienții care au prezentat profil genic centru germinativ au prezentat într-un procent de 42,6%, respectiv 45,8% răspuns terapeutic complet și parțial, în timp ce pacienții cu profil genic non-centru germinativ au prezentat într-un procent de 57,4%, respectiv 54,2% răspuns terapeutic complet și parțial. Semnificativ statistic a fost tipul de răspuns non-responsiv care a fost semnificativ crescut la pacienții non-centru germinativ.

Centru germinativ	Răspuns			Total
	complet	parțial	nonresponsiv	
da	Count 20 _a	11 _a	1 _a	32
% within Răspuns	42.6%	45.8%	16.7%	41.6%
Centru germinativ nu	Count 27 _a	13 _a	5 _a	45
% within Răspuns	57.4%	54.2%	83.3%	58.4%
Total	Count 47	24	6	77
% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament și asocierea pozitivității MYC și BCL6

Pacienții care au prezentat pozitivitate duală MYC și BCL 6, au prezentat răspuns complet și parțial în proporții apropiate 4,3%, respectiv 4,2%, însă cei care au fost non-responsivi au prezentat pozitivitate duală MYC/BCL 6 într-un procent mai mare (16,7%).

MYC/BCL6	Răspuns			Total
	complet	parțial	nonresponsiv	
altfel	Count 45 _a	23 _a	5 _a	73
% within Răspuns	95.7%	95.8%	83.3%	94.8%
da	Count 2 _a	1 _a	1 _a	4
% within Răspuns	4.3%	4.2%	16.7%	5.2%
Total	Count 47	24	6	77
% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament și asocierea pozitivității MYC, BCL6 și BCL2

Din totalul pacienților din lotul studiat, 16,7% cu pozitivitate triplă MYC/BCL2/BCL6 au fost non-responsivi și numai 4,3% dintre pacienți au prezentat răspuns terapeutic complet, în schimb, 16,7% dintre pacienții care au prezentat pozitivitate triplă au fost non-responsivi.

MYC/BCL2/BCL6		Răspuns			Total
		complet	parțial	nonresponsiv	
MYC/BCL2/BCL6	Count	45 _a	24 _a	5 _a	74
	altfel % within	95.7%	100.0%	83.3%	96.1%
	Răspuns				
	Count	2 _a	0 _a	1 _a	3
da % within	4.3%	0.0%	16.7%	3.9%	
Răspuns					
Total	Count	47	24	6	77
	% within	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	Răspuns				

Răspunsul la tratament și asocierea CD 34 și VEGFR

În urma coroborării dintre răspunsul la tratament și evaluarea CD 34 se constată următoarele:

Pacienții care au prezenta o microvascularizație scăzută 20 de vase sanguine/HPF (CD 34 pozitive), 12,8% au prezentat răspuns complet, 25% au prezentat răspuns terapeutic parțial, iar 16,7% au fost non-responsivi.

Dintre pacienții care au prezentat o vascularizație moderată 39 vase sanguine/HPF (CD 34 pozitive), 42,6% au prezentat răspuns complet, 12,5% au prezentat răspuns parțial, iar 16,7% au fost non-responsivi.

Pacienții care au prezentat o microvascularizație abundentă 53 vase sanguine/HPF au prezentat răspuns complet 44,7%, 58,3% au prezentat răspuns parțial, iar 66,7% au fost non-responsivi.

CD 34	Răspuns			Total
	complet	parțial	nonresponsiv	
Count 20	6 _a	6 _a	1 _a	13
% within Răspuns	12.8%	25.0%	16.7%	16.9%
Count 36	0 _a	1 _a	0 _a	1
% within Răspuns	0.0%	4.2%	0.0%	1.3%
CD 34 Count 39	20 _a	3 _b	1 _{a, b}	24
% within Răspuns	42.6%	12.5%	16.7%	31.2%
Count 53	21 _a	14 _a	4 _a	39
% within Răspuns	44.7%	58.3%	66.7%	50.6%
Total Count	47	24	6	77
% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Asocierea dintre răspunsul terapeutic și evaluarea expresiei VEGFR a fost următoarea:

Pacienții care au exprimat pozitivitate intensă VEGFR au fost non-responsivi în procent de 66,7%, 58,3% au avut răspuns terapeutic parțial și 44,7% au prezentat răspuns complet.

Pacienții care au prezentat pozitivitate VEGFR slabă au prezentat răspuns terapeutic complet într-un procent ridicat comparativ cu cei care au prezentat în egală măsură (16,7%) răspuns parțial sau au fost non-responsivi.

Dintre pacienții care au fost VEGFR negative, un sfert dintre aceștia au prezentat răspuns terapeutic parțial, cei mai puțini (12,8%) au prezentat răspuns terapeutic complet, iar 16,7% au fost non-responsivi.

VEGFR		Răspuns			Total		
		complet	parțial	nonresponsiv			
VEGFRnegativ	intens pozitiv	Count	21 _a	14 _a	4 _a	39	
		% within Răspuns	44.7%	58.3%	66.7%	50.6%	
		Count	6 _a	6 _a	1 _a	13	
		% within Răspuns	12.8%	25.0%	16.7%	16.9%	
		slab pozitiv	Count	20 _a	4 _a	1 _a	25
			% within Răspuns	42.6%	16.7%	16.7%	32.5%
Total		Count	47	24	6	77	
		% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Răspunsul la tratament și asocierea PDL-1/PD-1

În urma corelării răspunsului terapeutic și prezența PDL-1 în celule tumorale s-au constatat următoarele:

Pacienții care nu au prezentat pozitivitate PDL-1 în celule tumorale au prezentat răspuns terapeutic complet într-un procent de 6,4%, răspuns terapeutic parțial au prezentat 4,2% și nici unul nu a fost non-responsiv.

Dintre pacienții care au prezentat pozitivitate intensă PDL-1 în celule tumorale, cei mai mulți (83,3%) au fost non-responsivi, 62,5% au prezentat răspuns terapeutic parțial și puțini peste jumătate (53,2%) au prezentat răspuns terapeutic complet.

Pozitivitatea PDL-1 slabă în celule tumorale s-a asociat într-un procent ridicat (40,4%) cu răspuns terapeutic complet, 33,3% răspuns terapeutic parțial și cei mai puțini (16,7%) au fost non-responsivi.

PDL-1			Răspuns			Total
			complet	parțial	nonresponsiv	
PDL-1	negativ in celule tumorale	Count	3 _a	1 _a	0 _a	4
		% within	6.4%	4.2%	0.0%	5.2%
	Răspuns					
	pozitiv in celule maligne	Count	25 _a	15 _a	5 _a	45
		% within	53.2%	62.5%	83.3%	58.4%
	Răspuns					
slab pozitiv in celule tumorale	Count	19 _a	8 _a	1 _a	28	
	% within	40.4%	33.3%	16.7%	36.4%	
Răspuns						
Total	Count	47	24	6	77	
	% within	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	
	Răspuns					

Asocierea dintre prezența PD-1 în celule din micromediul tumoral și răspunsul terapeutic a fost următoarea: pacienții din lotul de studiu care au prezentat un nivel scăzut PD-1 la nivelul micromediului tumoral au fost non-responsivi în proporție de 83,3%, iar 62,5 % au prezentat răspuns terapeutic parțial, în timp ce nivelul crescut de PD-1 la nivelul micromediului tumoral s-a asociat în proporție de 37,5%, respectiv 16,7% cu un răspuns terapeutic parțial restul fiind non-responsivi.

PD 1		Răspuns			Total	
		complet	parțial	nonresponsiv		
PD 1	crescut	Count	20 _a	9 _a	1 _a	30
		% within Răspuns	43.5%	37.5%	16.7%	39.5%
	scăzut	Count	26 _a	15 _a	5 _a	46
		% within Răspuns	56.5%	62.5%	83.3%	60.5%
Total		Count	46	24	6	76
		% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament și prezența macrofagelor tip M1 CD 68 pozitive în micromediul tumoral

Din totalul pacienților incluși în studiu, pacienții care au prezentat un număr crescut de macrofage tip M1 în micromediul tumoral (CD 68 pozitive), 57,4%, respectiv 62,5% au prezentat răspuns terapeutic complet și răspuns parțial. 66,7 % dintre pacienții care au prezentat un nivel scăzut de macrofage tip M1 (CD 68 pozitivi) au fost nonresponsivi.

CD 68		Răspuns			Total	
		complet	parțial	nonresponsiv		
CD 68	crescut	Count	27 _a	15 _a	2 _a	44
		% within Răspuns	57.4%	62.5%	33.3%	57.1%
	scăzut	Count	20 _a	9 _a	4 _a	33
		% within Răspuns	42.6%	37.5%	66.7%	42.9%
Total		Count	47	24	6	77
		% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament în funcție de asocierea pozitivității MYC și BCL2

Pacienții care au prezentat pozitivitate duală MYC/BCL 2 au prezentat răspuns terapeutic complet într-un procent de 8,5% comparativ cu pacienții care au prezentat răspuns terapeutic parțial (4,2%) și care au fost non-responsivi 16,7%.

MYC_BCL2		Răspuns			Total
		complet	parțial	nonresponsiv	
altfel	Count	43 _a	23 _a	5 _a	71
	% within Răspuns	91.5%	95.8%	83.3%	92.2%
da	Count	4 _a	1 _a	1 _a	6
	% within Răspuns	8.5%	4.2%	16.7%	7.8%
Total	Count	47	24	6	77
	% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament în funcție de asocierea pozitivității MYC și BCL6

Dintre pacienții din lotul studiat 16,7% au fost non-responsivi în timp ce 4,3%, respectiv 4,2% au prezentat răspuns terapeutic complet sau parțial.

MYC_BCL6		Răspuns			Total
		complet	parțial	nonresponsiv	
altfel	Count	45 _a	23 _a	5 _a	73
	% within Răspuns	95.7%	95.8%	83.3%	94.8%
da	Count	2 _a	1 _a	1 _a	4
	% within Răspuns	4.3%	4.2%	16.7%	5.2%
Total	Count	47	24	6	77
	% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Răspunsul la tratament în funcție de asocierea pozitivității MYC, BCL6 și BCL2

Pacienții care au prezentat triplă pozitivitate MYC/BCL6/BCL2 au prezentat răspuns terapeutic complet un procent foarte mic (4,3%), iar 16,7% au fost non-responsivi.

MYC_BCL2_BCL6	Răspuns			Total	
	complet	parțial	nonresponsiv		
altfel	Count	45 _a	24 _a	5 _a	74
	% within Răspuns	95.7%	100.0%	83.3%	96.1%
da	Count	2 _a	0 _a	1 _a	3
	% within Răspuns	4.3%	0.0%	16.7%	3.9%
Total	Count	47	24	6	77
	% within Răspuns	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Apariția recăderii și profilul genic (GEP)

Pacienții din lotul studiat care au prezentat conform profilului genic centru germinativ a prezentat într-un procent de 27,3% recăderea în timp ce pacienții încadrați în subtipul non-centru germinativ au prezentat recădere în proporție de 31,9%.

Recădere	Centru germinativ		Total
	da	nu	
da	Count 9 _a	15 _a	24
	% within Centru germinativ	27.3%	31.9%
Recădere	Count	32 _a	56
nu	% within Centru germinativ	72.7%	68.1%
Total	Count	33	47
	% within Centru germinativ	100.0%	100.0%

Apariția recăderii și asocierea pozitivității MYC și BCL6

Pacienții care au prezentat recădere au prezentat în proporții egale (50%) pozitivitate duală MYC/BCL6 comparativ cu cei care nu au prezentat recădere.

Recădere	MYC_BCL6		Total
	altfel	da	
da	Count 22 _a	2 _a	24
	% within MYC_BCL6_poz	28.9%	50.0%
Recădere	Count	54 _a	56
nu	% within MYC_BCL6_poz	71.1%	50.0%
Total	Count	76	4
	% within MYC_BCL6_poz	100.0%	100.0%

Apariția recăderii și asocierea pozitivității MYC, BCL6 și BCL2

Dintre cei 3 pacienți care au prezentat expresie triplă MYC/BCL2/BCL6 unul a prezentat recădere.

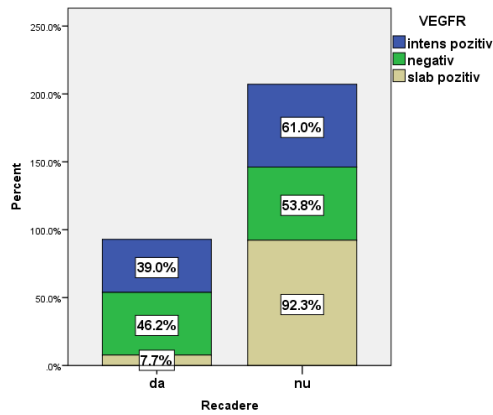
Recădere	MYC_BCL2_BCL6		Total
	altfel	da	
Count da	23 _a	1 _a	24
% within MYC_BCL2_BCL6_poz	29.9%	33.3%	30.0%
Count nu	54 _a	2 _a	56
% within MYC_BCL2_BCL6_poz	70.1%	66.7%	70.0%
Count Total	77	3	80
% within MYC_BCL2_BCL6_poz	100.0%	100.0%	100.0%

Apariția recăderii și asocierea cu CD 34 vs VEGFR

Pacienții care au prezentat recădere, au asociat VEGFR negativ în proporție de 46,2% și VEGFR intens pozitiv în proporție de 39% remarcându-se o diferență semnificativ statistică față de grupul cu VEGFR slab pozitiv în proporție de 7,7%. (p value – 0,009249)

Recădere	VEGFR			Total
	intens pozitiv	negativ	slab pozitiv	
Count da	16 _a	6 _a	2 _b	24
% within VEGFR	39.0%	46.2%	7.7%	30.0%
Count nu	25 _a	7 _a	24 _b	56
% within VEGFR	61.0%	53.8%	92.3%	70.0%
Count Total	41	13	26	80
% within VEGFR	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

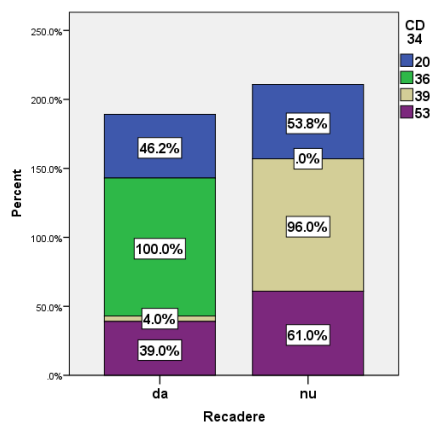
Test: Pearson Chi-Square, p_value=0.009249



Pacienții care au prezentat recădere, au asociat în proporție de 46,2% microvascularizație intratumorală scăzută CD 34 pozitiv, în proporții apropiate 39%, asociază recăderea și pacienții care au prezentat intratumoral vascularizație crescută (CD 34/53 vase sanguine).

Recădere	CD 34				Total	
	20	36	39	53		
da	Count	6 _a	1 _a	1 _b	16 _a	24
	% within CD 34	46.2%	100.0%	4.0%	39.0%	30.0%
nu	Count	7 _a	0 _a	24 _b	25 _a	56
	% within CD 34	53.8%	0.0%	96.0%	61.0%	70.0%
Total	Count	13	1	25	41	80
	% within CD 34	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Test: Pearson Chi-Square, p_value=0.000874



Apariția recăderii și asocierea cu pozitivitatea PDL-1/PD-1

În cadrul pacienților care au prezentat pozitivitate PDL-1 în celule tumorale, pacienții care au prezentat pozitivitate intensă și slabă au prezentat recădere în proporție de 32,6%, respectiv 24,1% în timp ce pacienții care au prezentat negativitate PDL-1 în celule tumorale au prezentat recădere într-un procent de 40%.

Recădere	PDL-1			Total
	negativ în celule tumorale	pozitiv în celule maligne	slab pozitiv în celule tumorale	
da	Count 2 _a	15 _a	7 _a	24
	% within PDL-1	40.0%	32.6%	24.1%
Recădere	Count 3 _a	31 _a	22 _a	56
	% within PDL-1	60.0%	67.4%	75.9%
Total	Count 5	46	29	80
	% within PDL-1	100.0%	100.0%	100.0%

Pacienții care au prezentat un procent PD-1 crescut în celule imune din micromediul tumoral au prezentat recădere în procent de 28,1% în timp ce pacienții care au prezentat PD-1 scăzut în micromediul tumoral au prezentat recădere în proporție de 31,9%.

Recădere		PD -1		Total	
		crescut	scăzut		
Recădere	da	Count	9 _a	15 _a	24
		% within PD 1	28.1%	31.9%	30.4%
	nu	Count	23 _a	32 _a	55
		% within PD 1	71.9%	68.1%	69.6%
Total		Count	32	47	79
		% within PD 1	100.0%	100.0%	100.0%

Apariția recăderii și prezența macrofagelor tip M1 CD 68 pozitive în micromediul tumoral

Proporția de macrofage de tip M1 CD 68 pozitive într-un procent crescut asociază recădere în proporție de 26,7% comparativ cu 34,3% pentru lotul de pacienți care a prezentat macrofage de tip M1 CD 68 pozitive într-un procent scăzut.

Recădere		CD 68		Total	
		crescut	scăzut		
Recădere	da	Count	12 _a	12 _a	24
		% within CD 68	26.7%	34.3%	30.0%
	nu	Count	33 _a	23 _a	56
		% within CD 68	73.3%	65.7%	70.0%
Total		Count	45	35	80
		% within CD 68	100.0%	100.0%	100.0%

Concluzii

În lotul de studiu prezentat au predominat bărbații (51,2%), raportul bărbați/femei fiind 1,05: 1, majoritatea pacienților au prezentat vârste între 50 și 80 de ani, vârsta medie fiind de 57 ani.

Majoritatea pacienților au fost diagnosticați inițial cu localizare ganglionară (80%), restul prezentându-se cu localizare extraganglionară sau ambele (20%). Dintre pacienții cu localizări extraganglionare, cele mai frecvente localizări tumorale au fost la nivelul tractului digestiv (13), urmate de localizarea în sfera ORL, iar localizarea la nivel măduvei osoase a fost prezentă la 4 pacienți. Media de supraviețuire a pacienților cu localizare extraganglionară a fost de 107,782 luni, cu o eroare standard de 6,245, cu o supraviețuire inferioară după 12 luni de la diagnostic.

Conform algoritmului Hans, profilul genic al limfoamelor difuze cu celulă mare B a fost într-un procent de 41,3% de tip centru germinativ și 48,8% non-centru germinativ/celulă activată. În urma analizei supraviețuirii, pacienții care au prezentat profil genic celulă activată au înregistrat 3 decese și o scădere a supraviețuirii în primele 6 luni de la diagnostic. Media timpului de supraviețuire estimată până la deces pentru cei cu centru germinativ a fost de 109,526 luni, în timp ce pentru cei cu celulă activată a fost de 106,015. Mediana timpului de supraviețuire calculată pentru pacienții non-centru germinativ a fost de 103 luni. Recăderea s-a înregistrat într-un procent de 27,3% la pacienții care au prezentat profil genic de tip centru germinativ și la 31,9% la cei cu celulă activată. Pacienții cu GEP non-centru germinativ au fost non-responsivi într-un procent de 83,3%.

În lotul studiat, puțin peste jumătate dintre pacienți (58,8%) au prezentat răspuns terapeutic complet, 30% au prezentat răspuns parțial și restul de 11,3% au fost non-responsivi, în timp ce 30% au prezentat recădere.

În urma analizei biomarkerilor PDL-1/PD-1, pozitivitatea intensă s-a asociat cu profilul genic de tip non-centru germinativ și localizarea extraganglionară, în timp ce profilul genic centru germinativ s-a asociat într-un procent ridicat cu nivelul crescut al PD-1 în celulele immune, ceea ce îi conferă acestuia din urmă un prognostic favorabil. Pozitivitatea PDL-1 de diferite intensități, intensă și slabă au prezentat recădere în proporție de 32,6, respectiv 24,1% în timp ce pacienții cu negativitate PDL-1 în celule tumorale au prezentat recădere într-un procent de 40%. Pozitivitate intensă PDL-1 în celule tumorale a fost prezentă la cei mai mulți dintre pacienți (83,3%) fiind non-responsivi. Peste

jumătate dintre pacienți (62,5%) au prezentat răspuns terapeutic parțial și puțini peste jumătate (53,2%) au prezentat răspuns terapeutic complet. Pacienții care nu au prezentat pozitivitate PDL-1 în celule tumorale au prezentat răspuns terapeutic complet într-un procent de 6,4%, răspuns terapeutic parțial 4,2% și nici unul nu a fost non-responsiv. Media de supraviețuire până la deces pentru lotul de pacienți cu PD-1 crescut în limfocite din micromediul tumoral a fost 104,100 luni în timp ce mediana de supraviețuire a fost 103,00 luni. Supraviețuirea pacienților în primele 6 luni a fost de 97,5% pentru PD-1 scăzut în micromediul tumoral. Din totalul de pacienți din lotul studiat, 47 dintre aceștia au prezentat pozitivitate scăzută PD-1 în limfocite T și 2 dintre aceștia au prezentat eveniment de deces. Restul de 32 au prezentat pozitivitate crescută PD-1 în limfocite T.

În lotul studiat s-a demonstrat o asociere între densitatea microvascularizației și expresia crescută VEGFR. Cele mai multe decese (3) s-au înregistrat la pacienții care au prezentat vascularizație crescută, la pacienții care au prezentat vascularizație intermediară s-a înregistrat un singur deces. Pacienții care au prezentat recădere au asociat VEGFR negativ în proporție de 46,2% și VEGFR intens pozitiv în proporție de 39%, remarcându-se o diferență semnificativ statistic față de grupul cu VEGFR slab pozitiv în proporție de 7,7%. (p value – 0,009249). Am găsit numai în subgrupul DLBCL non-centru germinativ o corelație semnificativă statistic între densitatea crescută a microvascularizației și expresia crescută a VEGF. Pacienții care au exprimat pozitivitate intensă VEGFR au fost non-responsivi în procent de 66,7%, 58,3% au avut răspuns terapeutic parțial și 44,7% au prezentat răspuns complet. Dintre pacienții care au fost VEGFR negativi un sfert au prezentat răspuns terapeutic parțial, cei mai puțini (12,8%) au prezentat răspuns terapeutic complet, iar 16,7% au fost non-responsivi. Pacienții care au prezentat o microvascularizație abundentă, 44,7% au prezentat răspuns complet, 58,3% au prezentat răspuns parțial, iar 66,7% au fost non-responsivi.

Procentul crescut al macrofagelor în micromediul tumoral fost de 56,3%, în timp ce valorile scăzute au fost prezente la 43,2% dintre pacienți. Procentul crescut de macrofage de tip M1 CD 68 se asociază cu un risc scăzut IPI, cu un status de performanță ECOG 2 și se asociază de asemenea cu GEP de tip centru germinativ, iar răspunsul complet s-a înregistrat la 57,4% dintre pacienți, comparativ cu 66,7% dintre cei care au prezentat un nivel scăzut de CD 68 care au fost non-responsivi.

Pacienții tratați cu Rituximab (antiCD20) au prezentat o tendință de ameliorare a supraviețuirii în comparație cu cei netratați cu semnificație statistică .

Pozitivitatea duală MYC/BCL6 a fost prezentă la 4 dintre pacienții din lotul studiat, și s-a asociat cu GEP non-centru germinativ. 16,7% dintre pacienți au fost non-responsivi, în timp ce 4,2% au prezentat răspuns terapeutic complet și parțial. Jumătate dintre pacienți au prezentat recădere, înregistrându-se 3 decese .

Pozitivitatea triplă MYC/BCL2/BCL6 s-a asociat cu GEP non-centru germinativ și a fost prezentă la 3 dintre pacienții din lotul studiat, înregistrându-se 2 decese. Media de supraviețuire a fost de 9,5 luni și o mediană de supraviețuire de 6 luni, cu o scădere a supraviețuirii în primele 12 luni față de cei fără asociere triplă pozitivă. Răspunsul terapeutic la pacienții care au prezentat pozitivitate triplă a fost complet într-un procent de 4,3%, iar pentru cei non-responsivi a fost de 16,7%.

Pozitivitatea duală MYC și BCL2 s-a asociat cu GEP de tip non-centru germinativ, în 66,7% se asociază cu boala voluminoasă, însă în același procent nu au prezentat reducerea masei tumorale au prezentat răspuns terapeutic complet într-un procent de 8,5% comparativ cu pacienții care au prezentat răspuns terapeutic parțial (4,2%) și care au fost non-responsivi 16,7%.

În studiul de față, micromediul tumoral a influențat răspunsul la tratament, și supraviețuirea ceea ce demonstrează că studiul multiplilor factori de la nivelul micromediului tumoral, reprezintă componente cu impact predictiv puternic la pacienții tratați cu R-CHOP.

Îmbunătățirea înțelegerii rolului micromediului tumoral și a biologiei tumorale duce la progrese diagnostice, prognostice și ale clasificării, dar și în dezvoltarea unor noi ținte terapeutice la pacienții diagnosticați cu malignități hematologice, în special în formele agresive prezentate în studiul de față.

Bibliografie selectiva

Morton LM, Slager SL, Cerhan JR et al. Etiologic heterogeneity among nonHodgkin lymphoma subtypes: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014; 130–144. 3.

Sant M, Minicozzi P, Mounier M et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 931–942.

Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26(Suppl. 5): v116–v125

Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER*Stat Database, North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) Incidence-Cancer in North America (CiNA) Analytic File, 2001–2012. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan. 63(1):11-30.

Howell JM, Auer-Grzesiak I, Zhang J, et al. Increasing incidence rates, distribution and histological characteristics of primary gastrointestinal non-Hodgkin lymphoma in a North American population. *Can J Gastroenterol*. Jul 2012. 26(7):452-6.

Flowers CR, Shenoy PJ, Borate U, et al. Examining racial differences in diffuse large B-cell lymphoma presentation and survival. *Leuk Lymphoma*. 2013 Feb. 54(2):268-76. [Medline]

Minard-Colin V, Brugieres L, Reiter A, et al. Non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: progress through effective collaboration, current knowledge, and challenges ahead. *J Clin Oncol*. 2015;33:2963-2974.