

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



TEZĂ DE DOCTORAT

**ASPECTE DIAGNOSTICE, HISTOPATOLOGICE ȘI
IMUNOHISTOCHEMICE ÎN LIMFOMUL DIFUZ CU CELULĂ MARE B**

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Laurențiu Mogoantă

Student doctorand:

Pătrașcu (Picleanu) Ana-Maria

Craiova

2017

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

I.	ȚESUTUL LIMFOID ȘI ORGANELE LIMFOPOIETICE	1
II.	ETIOPATOGENIA LIMFOMULUI DIFUZ CU CELULA MARE B.....	6
III.	CLASIFICARE ȘI STADIALIZARE	11
IV.	MORFOLOGIE ȘI CITOGENETICĂ	23
V.	DIAGNOSTIC	32
VI.	TRATAMENTUL LIMFOAMELOR DIFUZE CU CELULĂ MARE B	39
VII.	TRANSPLANTUL DE CELULE STEM HEMATOPOIETICE	50

PARTEA SPECIALĂ

I.	SCOPUL ȘI OBIECTIVELE SPECIFICE	55
II.	STUDIUL CLINICO-DEMOGRAFIC	57
II.1.	Material și metodă	57
II.2.	Rezultate.....	63
III.	STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC	72
III.1.	Material și metodă	72
III.2.	Rezultate	84
IV.	EVALUAREA RĂSPUNSULUI TERAPEUTIC	113
IV.1.	Material și metodă	113
IV.2.	Rezultate	116
V.	DISCUȚII	123
VI.	CONCLUZII	134
	BIBLIOGRAFIE	136

PARTEA GENERALĂ

I. ȚESUTUL LIMFOID ȘI ORGANELE LIMFOPOIETICE

Țesutul limfoid și organele limfopoietice sunt componente importante ale sistemului limfatic. Țesutul limfoid se împarte în funcție de modelul de distribuție al limfocitelor în țesut limfoid difuz și foliculi limfatici. Țesutul limfoid difuz este întâlnit între foliculii limfatici amigdalieni, în corticala profundă și medulara ganglionilor, în tecile periarteriolare din splină și în plăcile Payer din intestinul subțire. Organe limfoide cuprind timusul, homomedula în viața intrauterină, splina, limfoganglionii și amigdalele.

II. ETIOPATOGENIA LIMFOMULUI DIFUZ CU CELULA MARE B

Incidența LMNH în Statele Unite este, actual, de 15.1 cazuri la 100 000 de locuitori/an, iar a DLBCL poate ajunge la 4.68 cazuri la 100 000 locuitori/an. DLBCL își are originea în celulele B mature aflate în anumite stadii de diferențiere. În celulele B au loc schimbări, în sensul dezvoltării transformării neoplazice, induse de mutații genetice. Factorii frecvent implicați în patogenia LMNH sunt: anomaliile genetice congenitale, factorii de mediu, infecțiile, inflamația cronică și imunodeficiența.

III. CLASIFICARE ȘI STADIALIZARE

Peste 80% din cazurile de LMNH sunt derivate din celula B, circa 15% au origine în celulele T sau NK, restul fiind derivate din macrofage. LMNH au fost clasificate în funcție de prognostic în trei grupuri, LMNH indolente, cu malignitate intermediară și cu malignitate înaltă. Istoric, una dintre primele clasificări a limfoamelor a fost cea introdusă de *Rappaport* în 1966. Au urmat o serie de alte clasificări: Kiel, International Working Formulation (IWF), clasificarea Europeano-Americană revizuită (REAL), ultima clasificare propusă fiind cea a Organizației Mondiale a Sănătății, apărută în 2001, actualizată în 2016.

IV. MORFOLOGIE ȘI CITOGENETICĂ

Deși evaluarea și stadializarea DLBCL implică o varietate de studii de laborator și imagistice, o secțiune dintr-un ganglion limfatic excizat colorată cu hematoxină și eozină (H&E) reprezintă pilonul de bază în diagnosticul patologic. Aspectul microscopic al nodulului limfatic este de

proliferare tumorală difuză, parțială sau completă, uneori sinusală sau interfoliculară. Frecvent apare și invazia extranodală, ce se poate însoți de scleroză secundară. Cel mai folosit algoritm imunohistochimic pentru clasificarea DLBCL este algoritmul Hans ce structurează DLBCL în cele două subtipuri principale menționate mai sus (GCB și non-GCB), prin analiza a trei markeri esențiali: CD10 (marker GCB), MUM1 (multiple myeloma oncogene 1) și bcl-6 (polyclonal B-cell lymphoma 6) asociat atât cu subtipul GCB cât și cu cel ABC. Atunci când sunt exprimate concomitent CD10 și MUM1, DLBCL este clasificat ca fiind de tip GCB. Există însă și excepții, notabile fiind cazurile de limfoame cu celulă mare B fără reacție pozitivă la niciunul dintre cei trei markeri.

V. DIAGNOSTIC

Pacienții cu DLBCL prezintă un spectru larg de simptome clinice. Deși există o frecvență implicare nodală, totuși la un procent semnificativ de cazuri (de până la 40% dintre pacienți) se poate observa și afectarea extranodală (tegumente, tub digestive, sistem osos os, sistem nervos central, etc). Aceasta, alături de asocierea unor simptome de ordin general (sindrom febril, transpirații profuze, scădere în greutate), sugerează de cele mai multe ori existența unui fenotip mai agresiv. Hemoleucograma poate fi normală sau putem întâlni anemie, trombocitopenie și/ sau leucopenie cauzate de insuficiența medulară sau prin fenomene autoimune. Este indicată efectuarea tomografiei computerizate (CT) sau PET-CT pentru evaluarea extensiei bolii.

VI. TRATAMENTUL LIMFOAMELOR DIFUZE CU CELULĂ MARE B

Managementul pacienților cu limfom difuz oferă multiple opțiuni în funcție de stadiul bolii, de afectarea unui organ specific, de vârstă sau de recăderea după o remisiune inițială. Ghidurile ESMO 2015 împart pacienții în funcție de vârstă și de factorul de prognostic IPI, în următoarele categorii: pacienți tineri cu risc scăzut fără masă bulky, cu risc scăzut sau intermediar cu masă bulky, cu risc înalt sau intermediar-înalt, pacienți cu vârsta cuprinsă între 68-80 ani, și pacienți cu vârsta de peste 80 ani. Alte studii au împărțit pacienții în funcție de stadiul I și II Ann Arbor și stadiul III și IV Ann Arbor, cu adaptarea terapiei la vârstnici sau în cazul afectării SNC.

VII. TRANSPLANTUL DE CELULE STEM HEMATOPOIETICE

Transplantul de celule stem hematopoietice reprezintă o tehnică de tratament ce implică administrarea intravenoasă de celule stem hematopoietice proprii sau de la un donator HLA identic înrudit sau neînrudit, în vederea restabilirii hematopoiezei, oferind o posibilă vindecare pentru afecțiunile hematologice. Acesta implică folosirea chimioterapiei în doză mare, fiind utilizat după inducerea unei mielosupresii importante.

PARTEA SPECIALĂ

I. SCOPUL SI OBIECTIVELE SPECIFICE

Lucrarea de față își propune o analiză complexă comparativă și descriptivă a limfoamelor difuze cu celulă mare B, luând în discuție criteriile specifice de diagnostic necesare pentru determinarea cât mai exactă a formelor anatomo-clinice, topografice și evolutive. De asemenea își propune stabilirea unor corelații între modificările imunohistochimice și răspunsul terapeutic, în scopul creării unui algoritm viabil de diagnostic și tratament, adaptat fiecărei entități clinico-patologice.

II. STUDIUL CLINICO-DEMOGRAFIC

II.1. Material și metodă

Studiul de față și-a propus să evalueze retrospectiv toți pacienții internați în Serviciul de Hematologie al Spitalului Municipal Filantropia diagnosticați cu DLBCL de-a lungul ultimilor 10 ani (în intervalul ianuarie 2007 - decembrie 2016). Lotul populațional a însumat un număr de 97 de pacienți cu DLBCL cu localizări ganglionare și extraganglionare, în diverse stadii de evoluție. Diagnosticul a fost stabilit în urma examenului clinic, a investigațiilor biologice, imagistice, a examenului histopatologic și imunohistochimic (IHC). Datele obținute au fost introduse în tabelele bazei de date din Modulul Microsoft Access din pachetul de programe Microsoft Office 2007, fiind prelucrate cu ajutorul unui program de analiză statistică dedicat (GraphPad Prism 7.0).

II.2. Rezultate

Analiza bazei de date a Clinicii de Hematologie din Craiova a relevat 128 de cazuri recent descoperite de DLBCL între 2007 și 2016. Când au fost aplicate criteriile de excludere, 31 de cazuri au fost omise. Analiza incidenței în funcție de sex a indicat un raport M:F de 1.32, în timp

ce vârsta medie (\pm deviația standard) a fost de 56 de ani (\pm 14,67 ani), majoritatea pacienților (29 de cazuri) aparținând decadei a 6-a de vârstă. Din punct de vedere al repartiției cazurilor în funcție de mediul de proveniență, cele mai multe cazuri au fost înregistrate în mediul urban. Analizând repartiția cazurilor în funcție de momentul diagnosticului, se observă un vârf al incidenței în anul 2011 cu un total de 18 cazuri, urmat de 2015, cu 14 cazuri diagnosticate. În ceea ce privește repartiția cazurilor în funcție de stadializarea Ann-Arbor, s-a observat preponderența stadiilor avansate de boală: 57 de cazuri aflate în stadiile III și IV față de 40 de cazuri în stadiile I și II. În funcție de localizarea primară, marea majoritate a cazurilor au avut origine nodală (88% dintre pacienți). Dintre diferitele caracteristici clinico-patologice ale pacienților cu DLBCL, prezența simptomelor B și răspunsul terapeutic au indicat un nivel statistic semnificativ de corelație cu scorul IPI, în timp ce sexul nu pare să influențeze indicele de prognostic. Astfel, prezența simptomelor de tip B (65.9% din cazuri) s-a asociat cu un scor IPI între 3 și 5. Subtipul non-GCB prezintă un interes deosebit, deoarece prezintă o corelație foarte puternică cu scorul prognostic IPI.

Pacienții cu un indice înalt de prognostic au prezentat rate mai mici de supraviețuire ($p = 0.0008/0.0029$). Rata de supraviețuire la cinci ani în acest subgrup a fost de 19.9%, în timp ce pacienții cu IPI scăzut au avut o supraviețuire globală de 57.2%, diferențele fiind înalt semnificative. Analizând însă curbele Kaplan-Meier de estimare a intervalului liber de boală în cele două loturi, se observă că diferențele nu depășesc pragul de semnificație statistică decât în cazul testului Mantel-Cox. De asemenea, în cazul subgrupului GCB s-a observat o rată de supraviețuire la 5 ani de $67.5 \pm 7.58\%$ (medie \pm SEM) mult superioară față de subgrupul non-GCB ($16.59 \pm 5.3\%$). Același aspect a fost sesizat și în ceea ce privește intervalul liber de boală, pentru subgrupul non-GCB fiind înregistrată o rată de $33 \pm 8.89\%$, față de $73.3 \pm 7.45\%$ în cazul subgrupului GCB.

III. STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC

III.1. Material și metodă

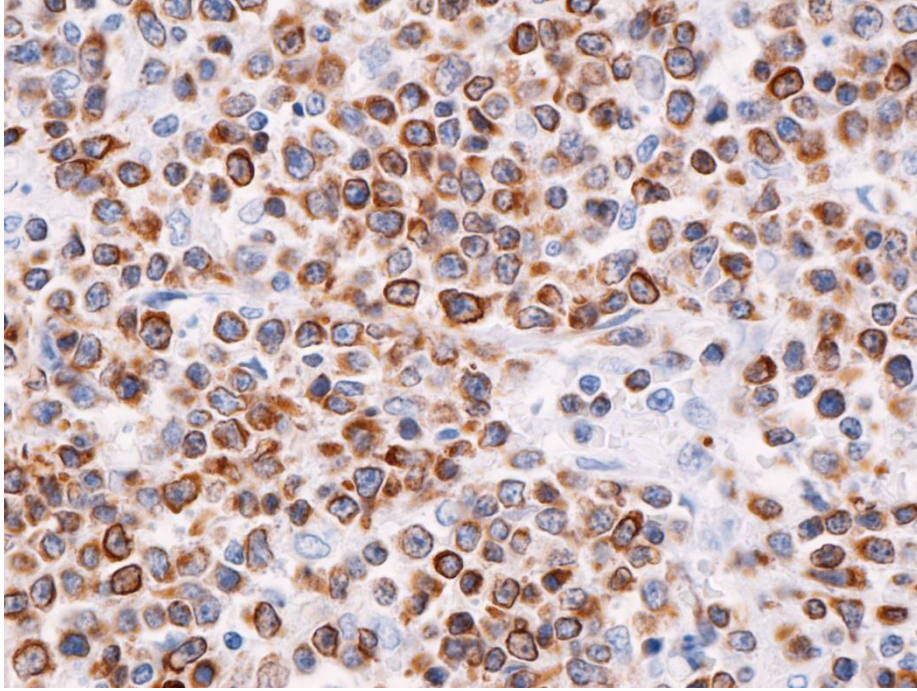
Studiul histopatologic a cuprins un număr de 97 de fragmente de exereză chirurgicală și endoscopică (biopsii excizionale sau piese de rezecție), provenind de la un număr similar de pacienți internați în Clinica de Hematologie a Spitalului Municipal Filantropia în perioada ianuarie 2007 - decembrie 2016 cu diagnosticul de DLBCL. Preparatele histologice au fost colorate cu hematoxilină-eozină și colorația tricromică Goldner-Szeckeli. Studiul imunohistochemic efectuat

de noi și-a propus să caracterizeze și să diferențieze tipurile de celule din limfomul cu celule B în funcție de o serie de markeri: CD10, Bcl6, MUM1 (necesari algoritmului Hans), Bcl2, p53, MYC, Ki67 (markeri cu potențial rol prognostic) și CD20, CD34 și CD 79a (markeri adiționali).

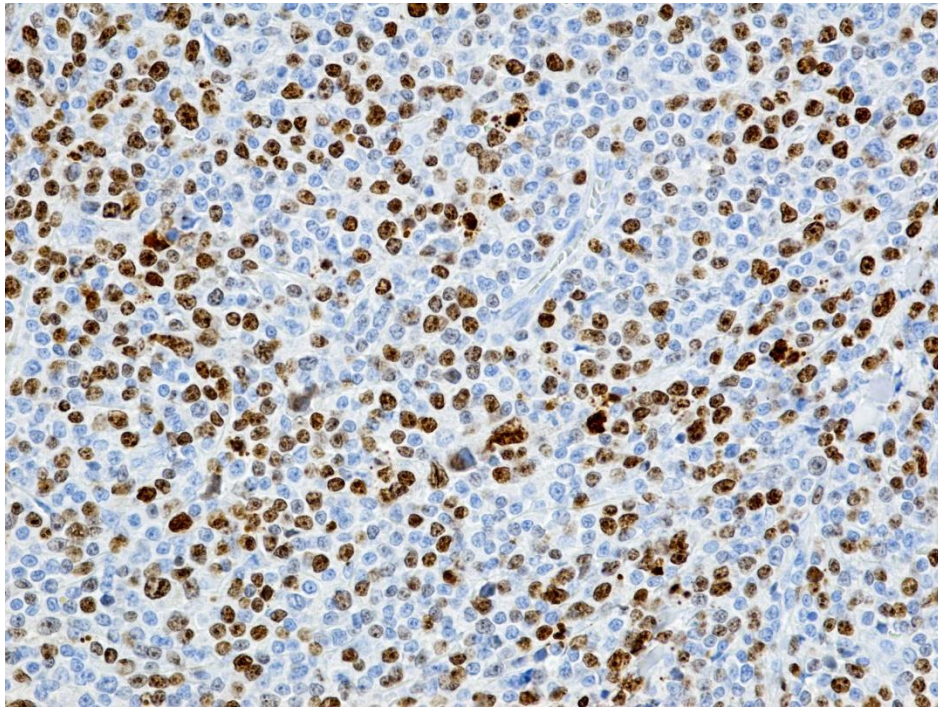
III.2. Rezultate

Rezultatul histopatologic a permis identificarea a 32 de limfoame de tip centroblastic, 17 cazuri de limfom imunoblastic și 5 forme de DLBCL de tip anaplazic. În 38 de cazuri examenul HP nu a precizat subtipul morfologic. Analiza subtipurilor imunohistochemice determinate conform algoritmului Hans au evidențiat 44 de cazuri în subgrupul GCB al DLBCL, 60% dintre acestea prezentând expresie pozitivă pentru MUM1, 35% pentru bcl6 și 44% pentru CD10. Analizând markerii de prognostic considerați, s-a observat ca 59% din cazuri au prezentat o reacție imunohistochimică intensă la anticorpii anti-Ki67, iar 49% din cazuri au fost bcl2+. P53 a avut o expresie pozitivă în 26% din cazuri, MYC fiind pozitiv în 32% dintre probe. Dintre markerii imunohistochimici secundari analizați am reținut următoarea distribuție: 3 cazuri CD3+ (din 15 analizate), 2 cazuri CD20- din 28 studiate, 6 cazuri CD23+ (40%) dintr-un total de 15 cazuri analizate și 14 cazuri CD79a pozitive (77.7%) din cele 18 luate în lucru.

Analiza Kaplan-Meier a evidențiat o tendință de scădere a supraviețuirii generale la 5 ani (32.6% față de 52.4%) și a supraviețuirii fără boală (23.9% față de 77.5%) la pacienții cu expresie Bcl2 pozitivă față de acele cazuri cu expresie redusă sau negativă. Supraviețuirea globală în grupul p53 negativ a fost de 55.6%, în timp ce pentru cazurile care au exprimat p53 supraviețuirea la 5 ani a fost de 22.8%. Mai mult, diferențe semnificative au fost observate și în cazul intervalului liber de boală, cu pacienții p53 negativi prezentând procente mai mari ale DFS (65.7% față de 35.3%). O altă proteină a cărei expresie s-a corelat negativ cu supraviețuirea redusă a fost MYC. Supraviețuirea globală în grupul MYC+ a fost semnificativ mai mică (9.72%) față de grupul MYC- (55.2 ± 6.74%), cu o tendință similară observată în cazul intervalului liber de boală.



Limfom difuz cu celulă mare B. Bcl2 intens pozitiv difuz în limfocitele tumorale; x400.



Limfom difuz cu celulă mare B. expresia Ki67 pozitivă în 70-80% din nucleii celulelor tumorale; x200.

IV. EVALUAREA RASPUNSULUI TERAPEUTIC

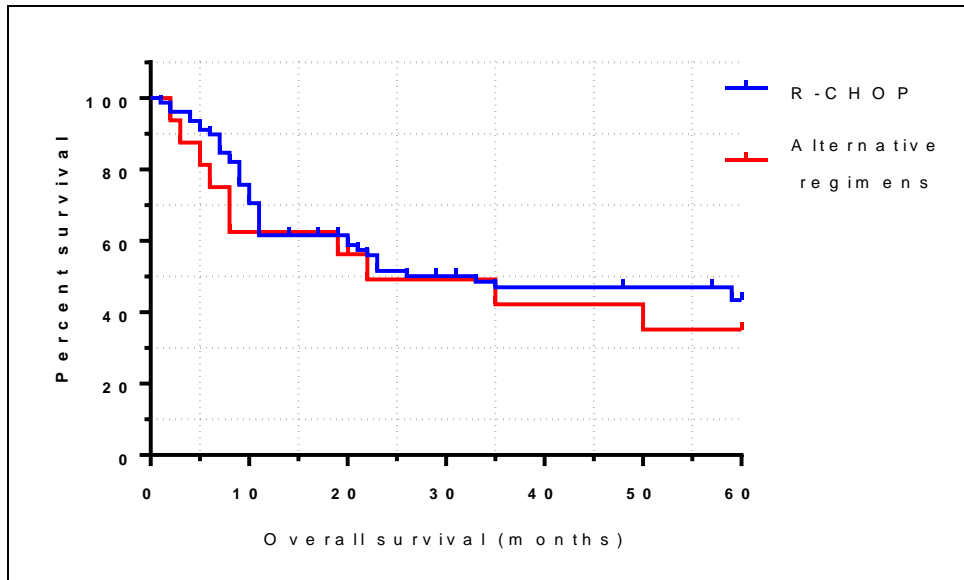
IV.1. Material și metodă

Pentru a monitoriza efectele chimioterapiei asupra evoluției bolii, o serie de teste biologice considerate relevante au fost înregistrate în baza noastră de date și analizate: nivelul hemoglobinei, al leucocitelor, limfocitelor și valorile LDH, la internare și la 6 luni. Protocoalele de tratament folosite au inclus regimul R-CHOP, R-miniCHOP, R-CHOEP și CEOP.

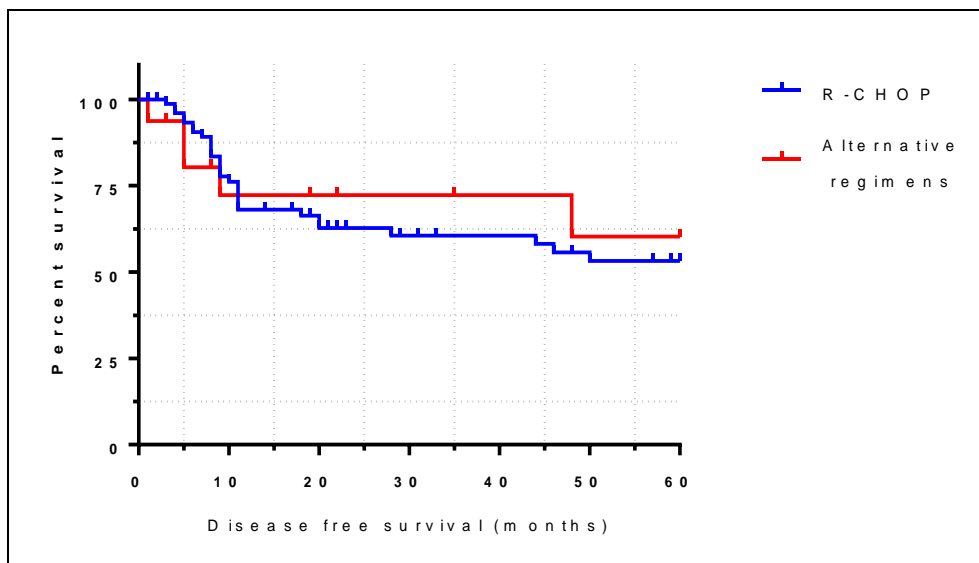
IV.2. Rezultate

În lotul analizat, cei mai mulți pacienți au fost supuși chimioterapiei standard (R-CHOP). Remisiunea completă a fost obținută la 72 de pacienți (74.22%), iar în 11 cazuri (11.34%) s-a obținut remisiune parțială. Paisprezece pacienți (14.43%) au fost refractari la tratament. Urmărirea parametrilor biologici pe durata tratamentului a evidențiat la internare o valoare medie a hemoglobinei de 11.8 g/dl (± 2.16), iar după regimul chimioterapic valoarea medie a fost de 12.08 g/dl (± 2.10), variația nefiind nesemnificativă ($p=0.66$) în intervalul de 6 luni. Un tipar similar a fost observat și în cazul leucocitelor, valoarea medie a acestora la internare ($8320 \text{ elem/mm}^3 \pm 4080$) fiind apropiată de valoarea medie înregistrată la 6 luni ($6972 \text{ elem/mm}^3 \pm 4445$). În privința limfocitelor s-a observat o scădere a numărului acestora (de la $8320/\text{mmc} \pm 4080$ în momentul diagnosticului, până la $6972/\text{mmc} \pm 4445$ la 6 luni), însă diferența nu a fost semnificativă statistic. Evaluarea nivelului VSH la momentul inițierii tratamentului a evidențiat valori înalte (medie $62 \text{ mm/h} \pm 42.8$), cu o reducere a valorilor principalilor parametri statistici analizați (medie $47.6 \text{ mm/h} \pm 30.7$) la 6 luni, fără însă a se atinge pragul de semnificație statistică. Urmărirea în dinamică a LDH-ului a evidențiat o medie la internare de $420.4 \text{ u/l} (\pm 153.6)$ care la 6 luni a înregistrat o scădere până la $343.9 \text{ u/l} (\pm 227.9)$.

Analiza curbelor de supraviețuire pentru pacienții care au urmat regimul R-CHOP (78 de pacienți), în raport cu cei cărora le-au fost administrate R-CHOEP sau R-miniCHOP (16 pacienți) nu a sesizat diferențe semnificative statistice în privința supraviețuirii globale, rata medie de supraviețuire la 5 ani în subgrupul R-CHOP fiind de 43.36%, față de 35.15% în cel de-al doilea grup.



Supraviețuirea la 5 ani (OS) a pacienților cu DLBCL care au urmat regimul R-CHOP în raport cu cei cu alte scheme terapeutice asociate cu Rituximab



Supraviețuirea liberă de boală (DFS) a pacienților cu DLBCL care au urmat regimul R-CHOP în raport cu cei cu altă schemă terapeutică asociată cu Rituximab.

V. DISCUȚII

Evaluarea rolului variabilității imunofenotipice pentru obținerea rezultatelor terapeutice a reprezentat pentru mult timp piatra de temelie în elaborarea strategiei de management a DLBCL, în mare parte deoarece tratamentul limfoamelor evoluează în direcția terapiilor moleculare țintite, obiectiv obținut prin înțelegerea biologiei tumorale și prin descoperirea unor noi căi de semnalizare. În ceea ce privește algoritmul terapeutic folosit în acest studiu, el nu diferă de cel standard, depinzând de mai mulți parametri, între care stadiul bolii, vârstă, stare generală și scorul IPI. Deși cel mai utilizat regim terapeutic a fost R-CHOP, celelalte scheme terapeutice (R-CHOEP/R-COEP, R-miniCHOP) au fost utilizate în situații particulare, la anumiți pacienți tineri cu factori de risc înalt sau intermediar, sau la vârstnici.

VI. CONCLUZII

Evaluarea și implementarea de rutină a clasificării DLBCL în funcție de celula de origine conform algoritmului Hans împreună cu scorul IPI sunt esențiale, deoarece ambii factori predictivi se corelează în mod pozitiv cu o serie de parametri clinico-terapeutici și pot servi ca instrument util în evaluarea diferitor criterii de supraviețuire. Expresia pozitivă a Bcl2, MYC, p53 și Ki-67 se corelează cu indicele prognostic și cu rata de supraviețuire scăzute, devenind astfel obiective valoroase de diagnostic și tratament.

Bibliografie selectivă:

1. Ansell SM, Armitage JO. Positron Emission Tomographic Scans in Lymphoma: Convention and Controversy Mayo Clin Proc. 2012; 87(6):571-580.
2. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Clinical Oncology. 1998; 16(8):2780-95.
3. Benevolo G, Stacchini A, Spina M, et al. Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. Blood. 2012; 120(16):3222-3228.

4. Carbone A, Gloghini A, Kwong YL, Younes A. Diffuse large B cell Lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol.* 2014; 93:1263-1277.
5. Daniel F, Carlheinz M, Dietrich WB, et al. Time-dependent effects of clinical predictors in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2016; 241-247.
6. Eichenauer DA, Engert A, André M, et al. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol,* 2014; 25:70-5.
7. Fletcher CD, Kahl BS. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of risks and prevention strategies in the post-rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(10):2228-40.
8. Ghilmini M, Vitolo U, Kimby E. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Annals of Oncology,* 2013; 24:561–576.
9. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60(5):277-300.
10. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* 2001; 20:5580–5594.
11. Nedomova R, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, Kluin PM. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood;* 2011; 117:2319-31.
12. Picleanu AM, Novelli S, Monter A, et al. Allogenic hematopoietic Stem Cell Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma. A retrospective analysis of 77 cases. *Ann Hematol.* 2017; 96(5):787-796.