
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Aplicații ale imunohistochimiei și tehnicilor de biologie moleculară în diagnosticul și tratamentul limfoamelor non-Hodgkin

Doctorand **Bogdan Fetica**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ljubomir Petrov**

Cluj-Napoca 2015



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Clasificarea, tabloul clinic și factori de prognostic clinici ai limfoamelor non-Hodgkin	17
1.1. Clasificarea limfoamelor non-Hodgkin	17
1.2. Tabloul clinic și factori de prognostic clinici ai limfoamelor non-Hodgkin	20
2. Patogeneza limfoamelor non-Hodgkin	23
2.1. Tulburările primare (înnăscute) ale funcției imune	23
2.2. Bolile autoimune, transplantul și imunosupresia	24
2.3. Agenții infecțioși și inflamația cronică.	25
2.4. Inflamația cronică	27
3. Aplicațiile imunohistochemiei în diagnosticul limfoamelor non-Hodgkin.	28
3.1. Markerii imunohistochimici utili în cazul celulelor B și neoplaziilor acestora	28
3.2. Markerii imunohistochimici utili în cazul celulelor T și neoplaziilor acestora	29
3.3. Alți markerii imunohistochimici utili în diagnosticul limfoamelor non-Hodgkin	30
4. Aplicațiile diagnostice și prognostice ale tehnicilor de imunohistochimie în studiul limfoamelor non-Hodgkin	32
4.1. Limfomul difuz cu celule B mari (DLBCL)	32
4.1.1. Markerii imunohistochimici diagnostici	32
4.1.2. Capcane diagnostice în diagnosticul limfoamelor difuze cu celule B mari	36
4.1.3. Markerii imunohistochimici cu valoare prognostică și biologia moleculară a DLBCL	36
4.2. Leucemia cronică limfocitară/ Limfomul cu celule mici	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	45
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	47
3. Studiu 1. Distribuția epidemiologică a limfoamelor non-Hodgkin în Nord-Vestul României	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru	49
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	62
3.6. Concluzii	66
4. Studiu 2. Studiul leziunilor limfoide cu malignitate incertă. Boala Castleman.	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru	68
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	76

5. Studiu 3. Markeri imunohistochimici prognostici în leucemia cronică limfocitară / limfomul cu celule mici: ZAP 70 și CD38	77
5.1 Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru.	77
5.3 Material și metodă	77
5.4. Rezultate	79
5.5 Discuții	84
5.6 Concluzii	86
6. Studiul 4. Factori de prognostic imunohistochimici în limfomul difuz cu celule B mari	87
6.1 Introducere	87
6.2. Ipoteza de lucru	87
6.3. Material și metodă	88
6.4 Rezultate	90
6.5 Discuții	97
6.6. Concluzii	99
7. Discuții generale	101
8. Concluzii generale	103
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

INTRODUCERE

Progresele recente din studiul neoplaziilor hematologice solide au pus în centrul atenției tehnicile de biologie moleculară, care au câștigat teren atât în ceea ce privește diagnosticul, dar și prognosticul și tratamentul. Cu toate acestea aplicarea progreselor, din domeniul biologiei moleculare a limfoamelor non-Hodgkin (NHL), în practică lasă de dorit. Explicația vine în principal din faptul că majoritatea centrelor specializate în diagnosticul și tratamentul NHL nu au acces la tehnicile de ultimă generație, acesta fiind de obicei disponibil în centre selectate orientate și pe cercetare.

Clasificarea Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) din 2008 a neoplaziilor limfoide reunește aceste progrese cu cele din domeniul clinic, cu datele de morfologie și imunohistochimie(IHC). Liantul între tehnicile de biologie moleculară și practica curentă este asigurat, în momentul de față, în multe centre din lume prin intermediul IHC. De altfel, activitatea din această lucrare este centrată în jurul aplicării progreselor din domeniul biologiei moleculare în practica curentă, prin intermediul IHC.

Domaniul de interes selectat este unul vast și extrem de heterogen. Conform clasificării OMS-2008 NHLs sunt subdivizate în mai multe categorii: neoplasme cu celule B precursorare, neoplasme cu celule B mature, neoplasme cu celule T precursorare, neoplasme cu celule T mature / neoplasme cu celule Natural Killer (NK). Neoplasmele cu celule B și T precursorare reprezintă cele mai comune neoplazii limfoide ale copilăriei. Neoplasme cu celule B periferice reprezintă 85% din NHL.

La nivel mondial se estimează că mai mult de 385.000 de cazuri de NHLs au fost diagnosticate în 2012, reprezentând 2,7% din cazurile noi de cancer. Incidența bolii variază în întreaga lume. Pentru anul 2010, în Regatul Unit (UK) a fost raportată o rată brută a incidenței de 20 de cazuri noi de NHLs la 100.000 de persoane, iar rata incidenței standardizată în funcție de vârstă (ASR) (populație europeană) a fost estimată la 15,1 [95% CI: 14,9 – 15,4]. Datele din baza de date GLOBOCAN a arătat pentru Europa Centrală și de Est (populație globală) o rată a incidenței standardizată în funcție de vârstă estimată pentru anul 2012 la 4,1 cazuri noi la 100.000 de persoane. În Asia de Sud-Est rata incidenței standardizată în funcție de vârstă (populație globală) este aproximată pentru aceeași perioadă la 4,7 cazuri noi la 100.000 de persoane.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Comparativ cu limfoamele Hodgkin, NHL se deosebesc prin prezentarea într-un stadiu avansat de boală, diseminare sistemică neregulată și imprevizibilă și un răspuns variat la terapie. Din punct de vedere al simptomatologiei, peste două treimi din pacienții cu NHL se prezintă cu adenopatii nedureroase, progresive, simptome generale și simptome ce pot fi datorate infiltrării directe de către celulele tumorale a diferitelor structuri anatomice: tegument, sân, stomac, sistemul nervos central (SNC), ficat, splină.

Din punct de vedere al comportamentului biologic limfoamele non-Hodgkin se clasifică după Fletcher în trei categorii: NHL indolente (limfomul folicular (FL), leucemia cronică limfocitară/limfomul limfocitic cu celule mici (CLL/SLL), limfomul limfoplasmatic, limfomul de manta (MCL) și limfomul splenic de zonă marginală (MZL)), NHL agresive (limfomul cu celule B mari, difuz(DLBCL), majoritatea limfoamelor cu celule T și ale celulelor natural-killer (NK) și limfomul anaplazic cu celule mari primar cutanat) și NHL extrem de agresive (limfomul Burkitt (BL) și limfomul limfoblastic). Dintre factorii clinici numeroase studii au arătat importanța stadiului bolii în momentul prezentării și a Indicelui de Prognostic Internațional (IPI).

Din punct de vedere patogenetic NHL constituie un grup de boli extrem de heterogen. Unul dintre factorii cheie în patogeniza NHL sunt modificările genetice. Astfel în cazul a peste 90% din NHL s-au identificat translocații rezultatul proceselor de rearanjare ce au loc în cursul maturării limfocitelor. Rearanjamentele genelor imunoglobulinelor pentru limfocitele B și a genelor ce codează receptorul limfocitelor T sunt momente necesare în cursul maturării limfocitelor, dar constituie etape vulnerabile din punct de vedere genomic. Dintre categoriile de factori implicați în patogeniza NHL amintim: tulburările imune primare (ce cuprinde peste 60 de entități), bolile autoimune, imunosupresia și transplantul, agenții infecțioși (în special infecțiile cronice latente) și inflamația cronică.

În lucrarea de față m-am concentrat pe studiul DLBCL și CLL/SLL deoarece împreună reprezintă peste 70%, din totalul NHL.

Utilitatea imunohistochimiei a fost mult timp limitată la contribuția diagnostică. Pe lângă valoarea diagnostică IHC s-a impus treptat ca și metodă de stratificare a pacienților în categorii de risc. În cazul CLL/SLL statusul mutațional al genei imunoglobulinei are probabil cea mai mare valoare prognostică. Tehnicile de secvențiere ADN au împărțit CLL/SLL în două categorii: cele care prezintă hipermutații somatice ale IVGH și o a două categorie ce nu prezintă mutații și care intră într-o categorie prognostică inferioară. La scurt timp au apărut markerii ZAP70 și CD38 ca și surrogat pentru studiile genetice. Aplicare lor s-a bazat inițial pe flow-citometrie. Ulterior acești markeri s-au aplicat pe materialul arhivat la parafină cu păstrându-și valoarea prognostică.

Studiile expresiei genice, în cazul DLBCL, au evidențiat două categorii prognostice importante, în funcție de stadiul de dezvoltare a celulei de origine (celule B germinale și cu fenotip de celule B activate). Aplicarea în practică a adus de la sine un număr mare de algoritmi

IHC meniți să reproducă cele două semnături genetice. Primul algoritm descris a fost cel al lui Hans și colaboratorii care au utilizat expresia CD10, MUM1/IRF4 și BCL6 pentru a încadra cazurile în categoriile imunohistochimice germinal și non-germinal. Algoritmul a fost validat în contextul terapiei CHOP(ciclofosamidă, doxorubicină, vincristină, prednison), însă în contextul terapiei cu RCHOP(rituximab-CHOP) semnificația prognostică a acestuia pare să se reducă. De asemenea, ultimii ani au adus în centrul atenției micromediul tumoral, ca și un factor cheie implicat în patogeneză și răspunsul la terapie. Astfel folosind același principiu ca și în cazul împărțirii în tipurile germinale și de celule activate B, Lenz și colaboratorii au definit două tipuri de semnături stromale în cazul DLBCL (tipul I bogat în macrofage și cu depozite abundente de matrice extracelulară și tipul II marcat de un proces amplu de neoangiogeneză). Meyer și colaboratorii săi au utilizat expresia SPARC (secreted protein, acid, and rich in cystein) pentru a reproduce semnătura stromală de tip I, folosind IHC. Mai mult decât atât Perry et al au utilizat, cu succes, algoritmul CHOI, expresia SPARC și densitatea medie vasculară într-un model biologic de prognostic pentru DLBCL.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiu 1. Distribuția epidemiologică a limfoamelor non-Hodgkin în Nord-Vestul României

Studiul 1 se axează pe epidemiologia NHL în regiunea de Nord- Vest a României. Studiul este structurat pe două direcții și cuprinde sumarizarea experienței diagnostice a Departamentului de Patologie al IOCN, prin prisma clasificării OMS 2008 a neoplaziilor limfoide. Lotul studiat cuprinde 184 de cazuri de NHL diagnosticate în perioada Ian 2004-Dec 2006. Rezultatele au fost validate prin evaluarea lor de către două grupuri independente, unul reprezentat de participanții din cadrul Departamentului de Patologie al IOCN, iar cel de-al doilea reprezentat de membrii **International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project**. Cea de-a doua direcție este reprezentată de datele de epidemiologie cu privire la NHL în regiunea de NV a României, extrase din Registrul de Cancer NV găzduit de IOCN.

Pentru seria IOCN mediana perioadei de urmărire a fost de patru ani. Din cele 184 de cazuri de NHL, 169 (91,8%) au fost limfoame cu celule B și 15 (8,2%) au fost limfoame cu celule T sau cu celule natural killer (NK). Limfomul difuz cu celule B mari (DLBCL) a fost cel mai frecvent subtip (43,5%), urmat de leucemia limfocitară cronică/limfomul cu celule mici (CLL/SLL; 21,2%), limfomul folicular (FL, 7,6%) și limfomul de manta (MCL, 6%). Limfoamele celulelor T/NK au fost reprezentate de 15 cazuri (8,2%), iar din acestea limfomul cu celule T angioimmunoblastic (AITL; 4 cazuri), urmat de limfomul cu celule T periferic, fără alte indicații (PTCL- NOS; 3 cazuri) au reprezentat cele mai frecvente tipuri histologice. Vârsta pacienților a

variat în intervalul 6-89 ani (mediana, 57 ani). Distribuția pe sexe a NHL arătat un raport între sexe de 0,94 (barbați:femei). Grupul de limfoame cu celule B "indolente" (CLL/SLL, limfomul folicular-FL și limfomul de zonă marginală- MZL, de tip MALT) au avut cea mai bună supraviețuire globală, iar pacienții cu MCL au avut ea mai redusă ($p = 0,0016$). Mediana supraviețuirii globale pentru limfoame cu celule B indolente a fost de 80,5 luni, cu o supraviețuire globală la cinci ani de 64,9%. MCL au avut mediana supraviețuirii globale de 16,47 luni și o supraviețuire globală la cinci ani de 9,1 %. Mediana supraviețuirii globale pentru DLBCL a fost de 15 luni, iar supraviețuirea globală la cinci ani a fost de 32,9%. Limfoamele cu celule T au avut mediana supraviețuirii globale de 18,7 luni, iar supraviețuirea globală la cinci ani a fost de 41,7%. S-au observat diferențe de supraviețuire între sexe și între diferitele intervale de vârstă. Sunt de asemenea furnizate date referitoare la numărul și costurile pe care utilizarea IHC le-a presupus. Epidemiologia NHL în regiunea de NV a arătat la fel ca și în cazul seriei IOCN predominanța DLBCL și CLL/SLL, ca și tipuri histologice cele mai frecvente.

În anul 2010, NHL au reprezentat, ca frecvență, al 19-lea tip de cancer diagnosticat la bărbați și al 14-lea la femei în regiunea de NV a României. Incidența NHL a fost mai mare la bărbați [rată de incidență standardizată în funcție de vârstă (populație globală) (ASR) – 5,29 / 100.000] comparativ cu sexul feminin (ASR – 3.67 / 100.000). Supraviețuirea relativă cumulativă standardizată în funcție de vârstă, la cinci ani pentru NHL (toate subtipurile combinate, cu excepția CLL / SLL), în județul Cluj, pentru perioada 2006-2010, a fost de 51,4% (44,5 – 58%). Limfomul de zonă marginală a avut cea mai bună rată relativă de supraviețuire la 5 ani de 61,7%. Limfom folicular avut cea mai redusă rată relativă de supraviețuire la 5 ani de 50,7%. S-au observat diferențe în funcție de sex ale supraviețuirii pentru diversele tipuri de NHL. Datele au fost comparate cu cele din literatură, provenite din Europa de Vest, Europa Centrală și de Est și Asia de Sud-Est.

Studiu 2. Studiul leziunilor limfoide cu malignitate incertă. Boala Castleman.

Studiul 2 sumarizează experiența personală în ceea ce privește boala Castleman. Studiul este conceput ca și un model de studiu al bolilor rare, hematologice, preneoplazice. Este prezentată o serie de 6 cazuri, pentru care sunt trecute în revistă într-o manieră unitară datele clinice și morfologice ale cazurilor, cu accent pe utilizarea imunohistochimiei. Sunt discutate și argumentate problemele de diagnostic diferențial. Subcapitoloul de discuții cuprinde o sumarizare a teoriilor patogenetice. Cu toate că numărul de cazuri este redus, este de notat faptul că datele prezentate sunt în concordanță cu cele din literatură. Limitarea numărului de cazuri este explicată prin faptul că suntem în fața unui studiu unicentric și prin raritatea bolii.

Studiu 3. Markeri imunohistochimici prognostici în leucemia cronică limfocitară / limfomul cu celule mici: ZAP 70 și CD38

Studiul 3 are în centru evaluarea factorilor prognostici imunohistochimici în cazul CLL/SLL. Selecția cazurilor a fost efectuată retrospectiv. Markerii utilizați au fost ZAP70 și CD38 ca și markeri surogat pentru absența mutației genei imunogloblinei. Materialul biologic disponibil, arhivat la parafină, a fost reprezentat de țesut limfoganglionar și de la nivel osteomedular, totalizând 35 de pacienți diagnosticați cu CLL/SLL în Institutului Oncologic "Ion, Chiricuță", Cluj-Napoca în perioada Ianuarie 2004- Decembrie 2006.

Mediana vârstei la momentul diagnosticului a fost de 60 ani. După o perioadă de urmărire medie de 60 de luni, 19 pacienți (54,28%) erau decedați la momentul efectuării analizei statistice. Expresia ZAP-70 s-a observat mai ales nuclear în celulele neoplazice și a fost considerată pozitivă în 19 cazuri (54,28%) și negativă în 16 cazuri (45,71%). În cazul a 16 pacienți (45,71%) CD38 a fost pozitiv, iar 19 cazuri (54,28%) au fost CD38 negative. În ceea ce privește distribuția pe sexe s-a constatat că barbatii au avut o supraviețuire mai bună la 5 ani în comparație cu femeile: 65,22% și 50% la 5 ani (log rank $p = 0,16$). Pacienții cu CLL/SLL a căror biopsii au prezentat expresia ambilor markeri (pacienți ZAP-70⁺CD38⁺) au fost caracterizați printr-o evoluție clinică nefavorabilă în comparație cu pacienții ZAP-70⁻CD38⁻. Expresia ambilor markeri s-a corelat cu o supraviețuire globală redusă. Corelația dintre expresia IHC a celor doi markeri și supraviețuirea globală a fost independentă de tipul de material biptic evaluat (biopsie limfoganglionară, biopsie osteomedulară). Studiul reprezintă cea mai mare serie de CLL/SLL testată pentru expresia ZAP70 și CD38 prin metode imunohistochimice pe material biptic provenit de la nivel limfoganglionar și de la nivel medular. Rezultatele acestui studiu sugerează faptul că evaluarea ZAP-70 și CD38 se poate efectua pe tesuturi fixate de rutină în formol și incluse în parafină, chiar și în cazul biopsiilor ostemedulare.

Studiu 4. Factori de prognostic imunohistochimici în limfomul difuz cu celule B mari

Studiul 4 este concentrat pe evaluarea factorilor prognostici în cazul DLBCL. Sunt atinse două domenii de interes în ceea ce privește patogeneza și prognosticul DLBCL: clasificarea cazurilor în categoriile *germinale* și *non-germinale* și micromediul tumoral. Împărțirea cazurilor în categoriile imunohistochimice, mai sus amintite, s-a bazat pe algoritmul descris de Hans și colab. Evaluarea micromediului tumoral s-a realizat folosind expresia SPARC. Studiul nu a putut confirma valoarea prognostică a algoritmului Hans în contextul terapiei cu Rituximab. Pentru expresia SPARC s-au pus în evidență diferențe semnificative, în ceea ce privește supraviețuirea între diferitele categorii prognostice (*Înalt, Redus, Negativ*). Mai mult decât atât s-a observat o relație direct proporțională între expresia SPARC și supraviețuire în contextul terapiei cu rituximab.

CONCLUZII GENERALE

Studiul populațional al NHL a analizat 184 de cazuri de NHL diagnosticate 2004-2006 în departamentul de patologie al IOCN. Cel mai frecvent subtip NHL în această serie a fost DLBCL (43,5%). Printre limfoamele indolente, cele mai frecvente au fost CLL/SLL (21,2%). Limfoame cu celule T/NK-celule au ocupat o proporție redusă, 15 de cazuri (8,2%). Cele mai frecvente subtipuri au fost AITL și PTCL-NOS.

Datele din Registrul de Cancer Nord Vest, au arătat că constatat că cel mai frecvent subtip de NHL din regiunea de NV a fost CLL/SLL (43%), urmat de DLBCL (36%). Limfomul folicular și limfoame cu celule T/NK au reprezentat fiecare 6% din toate cazurile. S-au observat diferențe între sexe în ceea ce privește rata incidenței standardizată în funcție de vârstă și supraviețuirea relativă cumulativă standardizată în funcție de vârstă, la cinci ani în special pentru DLBCL și FL.

Am prezentat o serie de cazuri de boala Castleman, cu accent pe aspectele clinice, patologia și descriere extinsă a IHC utilizată pentru diagnosticul final al cazurilor. Datele prezentate sunt în concordanță cu cele prezentate în literatura de specialitate. Studiul a subliniat asemenea rolul IHC în diferențierea dintre o patologie reactivă, cu potențial de evoluție malignă, și malignitatea netă. Consider că prin înțelegerea patogenezei leziunilor precursore vom câștiga o mai bună înțelegere a căilor care conduc la neoplazie.

Studiul expresiei ZAP-70 și CD38 reprezintă cea mai mare serie de CLL/SLL testată prin metode imunohistochimice pe material biptic provenit de la nivel limfoganglionar și de la nivel medular. Studiul a pus în evidență diferențe semnificative, în termeni de supraviețuire globală, prin gruparea pacienților în funcție de expresia ambilor markeri: ZAP-70 și CD38. Rezultatele obținute prin imunohistochimie au fost comparabile cu rezultatele studiilor din literatură care au folosit flow-citometria. Rezultatele acestui studiu sugerează faptul că evaluarea ZAP-70 și CD38 se poate efectua pe țesuturi fixate de rutină în formol și incluse în parafină, chiar și în cazul biospiilor ostemedulare sau altor țesuturi fixate în formol.

Studiul DLBCL a cuprins 80 de pacienți cu DLBCL diagnosticați cu DLBCL în cadrul Departamentului de Anatomie Patologică al IOCN. Lotul de pacienți pentru care am reușit încadrarea în categoriile imunohistochimice germinale sau non-germinale a cuprins 51 de pacienți. Umărind supraviețuirea pacienților la 5 ani, nu am putut confirma valoare prognostică a algoritmului descris de Hans și colaboratorii, în contextul terapiei cu rituximab. Algoritmul pare să își reducă capacitatea prognostică pe măsură ce numărul de cazuri evaluate scade.

Studiul expresiei IHC a SPARC a evaluat de 39 de pacienți diagnosticați cu DLBCL. Am obținut rezultate semnificative statistic în termeni de supraviețuire globală pentru cele trei categorii definite (înalt, redus, negativ). Cea mai bună supraviețuire (50%) a fost observată în cazul pacienților ce au avut o expresie înaltă a SPARC în materialul biopsic ($\geq 15\%$). Am putut astfel să confirm valoarea prognostică a acestui marker în ceea ce privește supraviețuirea globală la 5 ani a pacienților cu DLBCL, tratați cu R-CHOP.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Prin lucrarea de față am încercat să aduc noi dovezi referitoare la aplicabilitatea progreselor din domeniul biologiei moleculare a NHL, în practica de zi cu zi a specialității anatomiei patologice. Este de la sine înțeles că o parte din obiectivele propuse au fost studiate de către alte grupuri de cercetare. Însă consider că lucrarea de față în ansamblu ei aduce informații „*personalizate*” regiunii noastre geografice. Acest deziderat a stat la baza tezei mele, deoarece în regiunea noastră există un real deficit de informații referitoare la incidența NHL.

Am realizat primul studiu epidemiologic, real populațional, având ca și domeniu de interes NHL. Rezultatele obținute au arătat atât similarități cu datele din literatură, cât și diferențe. Acestea din urmă subliniază necesitatea unor studii epidemiologice de amploare, deoarece consider că, diferențele observate sunt, probabil multifactoriale.

De asemenea utilizarea imunohistochemiei pentru diagnosticul NHL în România este un domeniu care poate fi mult îmbunătățit. În acest sens susțin ideea introducerii unor ghiduri de practică în diagnosticul NHL, care să cuprindă și recomandările cu privire la utilizarea imunohistochemiei. Evaluarea costurilor necesare unui diagnostic imunohistchimic reprezintă în primul rând un argument în ceea ce privește eficientizarea utilizării IHC în țara noastră.

Unul dintre contraargumentele împotriva implementării ultimelor progrese din studiul neoplaziilor limfoide la noi în țară este reprezentat de costul ridicat. Acest fapt din punctul meu de vedere nu trebuie privit neapărat ca și un impediment ci mai mult ca o provocare pentru dezvoltare de tehnici practice cu un raport bun cost/calitate. Astfel utilizarea TMA ca tehnică complementară IHC reprezintă un exemplu pe care l-am aplicat cu succes în cercetarea mea.

Există situații practice și patologii a căror studiu este limitat de numărul redus de cazuri. Un astfel de exemplu este reprezentat de boala Castleman. Studiul acestei boli a fost realizat pentru a demonstra faptul că folosind un număr limitat de resurse (chiar limitându-mă la datele diagnostice) se pot aduce argumente științifice solide. Ceea ce am sperat să aduc în lumină a fost necesitatea utilizării eficiente a tuturor resurselor disponibile.

Un alt exemplu de utilizare a resurselor este reprezentat de studiul ZAP-70 și CD38 bazat pe material arhivat la parafină. Rezultatele inițiale au fost descrise folosind flow-citometria, însă am arătat că rezultate similare pot fi obținute folosind materialul arhivat.

Având în minte utilizarea eficientă a resurselor am demonstrat în lucrarea de față că folosirea materialului arhivat reprezintă o soluție, care aduce un număr suficient de cazuri pentru a atinge o semnificație statistică și costuri suficient de reduse pentru a putea fi realizate.

În lucrarea de față se aduc noi dovezi referitoare la aplicabilitatea progreselor din domeniul biologiei moleculare a NHL, în practica de zi cu zi a anatomiei patologice. Este de la sine înțeles că o parte din obiectivele propuse au fost studiate de către alte grupuri de cercetare, însă lucrarea de față în ansamblu ei aduce informații „*personalizate*” regiunii noastre geografice. Acest deziderat a stat la baza tezei, deoarece în regiunea noastră există un real deficit de informații referitoare la incidența NHL. Consider că în viitorul apropiat influența micromediului tumoral, în cazul NHL, va câștiga importanță în ceea ce privește prognosticul și terapia personalizată a cazurilor. De asemenea, studiul micromediului tumoral se încadrează pe direcția unui abordări individualizate a cazurilor cu NHL.

DOCTORAL THESIS SUMMARY

Application of immunohistochemistry and molecular biology techniques in the diagnosis and treatment of non-Hodgkin's lymphomas

PhD student **Bogdan Fetica**

PhD Coordinator Prof.dr . **Ljubomir Petrov**

Cluj-Napoca 2015



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Classification, clinical and clinical prognostic factors of non-Hodgkin lymphoma	17
1.1 Classification of non-Hodgkin lymphomas	17
1.2 The clinical setting and clinical prognostic factors of non-Hodgkin lymphomas	20
2. The pathogenesis of non-Hodgkin lymphomas	23
2.1 Primary disorders (innate) of the immune function	23
2.2 Autoimmune diseases, transplantation and immunosuppression	24
2.3 Infectious agents and chronic inflammation	25
2.4 Chronic inflammation	27
3. Immunohistochemistry applications in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma	28
3.1 Immunohistochemical markers useful for B cells and their neoplasms	28
3.2 Immunohistochemical markers useful for T cells and their neoplasms	29
3.3 Other useful immunohistochemical markers in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma	30
4. Diagnostic and prognostic applications of immunohistochemistry techniques in the study of non-Hodgkin's lymphoma	32
4.1. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)	32
4.1.1. Diagnostic immunohistochemical markers	32
4.1.2. Diagnostic pitfalls in the diagnosis of diffuse large B-cell lymphomas	36
4.1.3. Immunohistochemical prognostic markers and molecular biology of DLBCL	36
4.2. Chronic lymphocytic leukemia / small cell lymphoma	40
PERSONAL CONTRIBUTION	45
1. Hypothesis / aims	47
2. General Methodology	47
3. Study 1. Epidemiologic distribution of non-Hodgkin lymphomas in northwestern Romania	49
3.1. Introduction	49
3.2. Hypothesis	49
3.3. Material and method	50
3.4. Results	52
3.5. Discussions	62
3.6. Conclusions	66
4. Study 2. Study of lymphoid lesions with uncertain malignancy. Castleman disease. [134A]	67
4.1. Introduction	67
4.2. Hypothesis	68
4.3. Material and method	68
4.4. Results	69
4.5. Discussions	74
4.6. Conclusions	76
5. Study 3. Immunohistochemical prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia / small cell lymphoma: ZAP 70 and CD38 [157]	77
5.1. Introduction	77
5.2. Hypothesis	77
5.3. Material and method	77
5.4. Results	79
5.5. Discussions	84
5.6. Conclusions	86

6. Study 4. Immunohistochemical prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma	87
6.1 Introduction	87
6.2. Hypothesis	87
6.3. Material and method	88
6.4 Results	90
6.5 Discussions	97
6.6. Conclusions	99
7. General discussions	101
8. General conclusions	103
9. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107

INTRODUCTION

The recent advances in the study of solid hematological malignancies have placed in the focus the molecular biology techniques that have gained ground in both diagnosis as well as prognosis and treatment. However the application in practice of the molecular biology advances in non-Hodgkin lymphoma (NHL) is poor. The explanation comes mainly from the fact that most centers specialized in the diagnosis and treatment of NHL have limited access to cutting-edge techniques, which is usually available in selected centers orientated also on research.

The 2008 classification of the World Health Organization (WHO) of lymphoid malignancies brings together these progresses with those from the clinical domain, with the morphology data and immunohistochemistry (IHC). The bond between molecular biology techniques and practice is provided, at the moment, in many centers in the world by IHC. In fact, the activity of this thesis is centered on the implementation of the progresses of molecular biology in practice, by using IHC.

The selected domain is wide and extremely heterogeneous. According to the 2008 WHO classification NHLs are subdivided into several categories: precursor B cell neoplasms, neoplasms of mature B cell, precursor T cell neoplasms, neoplasms of mature T-cell neoplasms/Natural Killer cells (NK) neoplasms. Precursor B-cell and T-cell neoplasms are the most common childhood malignancies. Peripheral B cell neoplasms represent 85% on NHLs.

Worldwide it is estimated that more than 385.000 cases of NHLs were diagnosed in 2012, accounting for 2.7% of the new cases of cancer. The incidence varies worldwide. For 2010, the United Kingdom (UK) reported a crude incidence rate of 20 new NHLs cases per 100.000 people and the (ASR) (European population) was estimated at 15.1 [95% CI: 14.9 - 15.4]. The data from the GLOBOCAN database showed that for Central and Eastern Europe (world population) the age standardized incidence rate was estimated for 2012 at 4.1 cases per 100.000 people. In Southeast Asia the age standardized incidence rate (ASR world population) was approximated for the same period at 4.7 cases per 100,000 people.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Compared to Hodgkin lymphoma, NHL are distinguished by presentation in an advanced stage of disease, irregular systemic dissemination and unpredictable and varied response to therapy. In terms of symptomatology, over two thirds of patients with NHL present with painless lymphadenopathy, progressive, general symptoms and symptoms that may be due to the direct infiltration by tumor cells of various anatomical structures: skin, breast, stomach, central nervous system (CNS), liver, spleen.

In terms of biological behavior non-Hodgkin lymphomas are classified into three categories according to Fletcher: indolent NHL (follicular lymphoma (FL), chronic lymphocytic leukemia / lymphoma, small cell lymphoma (CLL / SLL) limfoplasmatic lymphoma, mantle cell lymphoma (MCL) and splenic marginal zone lymphoma (MZL)), aggressive NHL (large B cell lymphoma, diffuse (DLBCL), the majority of T-cell and natural killer (NK) cells lymphomas, and anaplastic large cell lymphoma, primary cutaneous) and highly aggressive NHL (Burkitt lymphoma (BL) and Hodgkin lymphoma). Among the clinical factors numerous studies have shown the importance of the stage of disease at the time of presentation and of the International Prognostic Index (IPI).

In terms of pathogenesis NHLs are a highly heterogeneous group of diseases. One of the key factors in the pathogenesis of NHL are genetic alterations. Thus for over 90% of NHL have been identified translocations as a result of rearrangement processes that occur during cell maturation. Immunoglobulin gene rearrangements for B lymphocytes and T cell receptor genes rearrangements are steps required during cell maturation, but are vulnerable stages from a genomic perspective. The factors involved in the pathogenesis of NHL include: primary immune disorders (which include more than 60 entities), autoimmune diseases, immunosuppression and transplantation, infectious agents (particularly chronic infections latent) and chronic inflammation.

In this paper I focused on the study of DLBCL and CLL / SLL because together they represent over 70% of all NHL.

The utility of immunohistochemistry has long been limited to the diagnostic contribution. In addition to the diagnostic value IHC has imposed gradually as a patient stratification method into risk categories. In the case CLL/SLL the mutational status of the immunoglobulin gene has perhaps the greatest prognostic value. DNA sequencing techniques have divided CLL/SLL into two categories: those that show somatic hypermutation of the IVGH and a second category that does not present with mutations and enter a lower prognostic category. Shortly after ZAP70 and CD38 markers appeared as a surrogate for genetic studies. Their application was initially based on flow-cytometry. Subsequently these markers were applied to archived material in paraffin, keeping their prognostic value.

Gene expression studies of DLBCL, highlighted two important prognostic categories depending on the stage of development of the cells of origin (B germinal cells and activated B

cell phenotype). The application in practice itself brought a large number of IHC algorithms meant to replicate the two genetic signatures. The first algorithm described was that of Hans and collaborators who used the expression of CD10, MUM1/IRF4 and BCL6 for assigning the cases into the germinal and non-germinal categories. The algorithm was validated in the context of CHOP therapy (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone), but in the context of therapy RCHOP (rituximab-CHOP) its prognostic significance seems to decrease. Also, recent years have brought into focus the tumor microenvironment, as a key factor involved in the pathogenesis and response to therapy of DLBCL. Thus using the same principle as in the case of the division into germinal center type and activated B-cell type, Lenz et al have defined two types of stromal signatures (type I macrophage rich and abundant deposits of extracellular matrix and type II marked by an extensive process of neoangiogenesis). Meyer and his colleagues used the expression SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) to reproduce, using IHC, the stromal signature type I. Moreover Perry et al have used successfully the Choi algorithm, the expression SPARC and vascular densities in a biologic prognostic model for DLBCL.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Epidemiologic distribution of non-Hodgkin lymphomas in northwestern Romania

The 1st study focuses on the epidemiology of NHL in the northwest region of Romania. The study is structured in two directions and includes summarization of the experience of the Department of Pathology Diagnostic IOCN, in the light of the 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms. The study group includes 184 cases of NHL diagnosed in the period January 2004-December 2006. The results were validated through their evaluation by two independent groups, one represented by participants from the Department of Pathology IOCN and the second represented by the members of the **International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project**. The second direction is represented by the epidemiological data on NHL in the northwestern region of Romania, extracted from the NW Cancer Registry hosted by IOCN.

For the series IOCN median follow-up was of four years. Of the 184 cases of NHL, 169 (91.8%) were B-cell lymphomas and 15 (8.2%) were T-cell lymphomas or natural killer (NK) cells lymphomas. Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) was the most common subtype (43.5%), followed by chronic lymphocytic leukemia / small-cell lymphoma (CLL / SLL, 21.2%), follicular lymphoma (FL, 7.6%), and mantle cell lymphoma (MCL, 6%). T-cell lymphoma/NK lymphoma were represented by 15 cases (8.2%), and from these angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL, 4 cases), followed by peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (NOS PTCL-, 3 cases) were the most common histological types. The patient age ranged from 6-

89 years (median 57 years). Gender distribution of NHL showed a sex ratio of 0.94 (males: females). The B cell "indolent" lymphomas Group (CLL / SLL, FL and MZL, MALT type) had the best overall survival and patients with MCL had the worst ($p = 0.0016$). Median overall survival for indolent B-cell lymphoma was 80.5 months, a five overall survival of 64.9%. MCL had a median overall survival of 16.47 months and a 5-year overall survival of 9.1 %. Median overall survival for of DLBCL was 15 months and the 5-year overall survival was 32.9%. T-cell lymphomas had median overall survival of 18.7 months and a 5-year overall survival of 41.7%. We observed survival differences between the sexes and between different age intervals. Also provided data are the number and cost of IHC used. Epidemiology of NHL showed in the northwest region as in the series IOCN the predominance DLBLC and CLL/SLL, as the most common histological types.

In 2010 NHL represented as frequency, the 19th type of cancer diagnosed in men and women the 14th in the northwestern region of Romania. NHL incidence was higher in men [age-standardized incidence rate (world population) (ASR) - 5.29 / 100,000] compared to females (ASR - 3.67 / 100,000). Cumulative 5-year age-standardized relative survival for NHL (all subtypes combined, excluding CLL / SLL), in the Cluj County, in the period 2006-2010, was 51.4% (44.5 - 58%). MZL had the best 5-year relative survival rate of 61.7%. FL had the lowest 5-year relative survival rate at of 50.7%. Differences by gender were observed for the survival of different types of NHL. The data were compared with the literature, from Western Europe, Central and Eastern Europe and Southeast Asia.

Study 2. Study of lymphoid lesions with uncertain malignancy. Castleman disease.

Study 2 summarizes the personal experience concerning Castleman's disease. The study is designed as a model for the study of rare hematological preneoplastic diseases. It presents a series of 6 cases, which are reviewed in consistent manner from a clinical and morphological point of view, focusing on the use immunohistochemistry. The differential diagnosis problems are discussed and argued. The discussion subchapter includes a summary of the pathogenetic theories. Although the number of cases is reduced, it is noted that the data presented are consistent with the literature. The limitation of the number cases is explained by the fact that we are facing a single-center study and by the rarity of the disease.

Study 3. Immunohistochemical prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia / small cell lymphoma: ZAP 70 and CD38

Study 3 is centered on the evaluation of IHC prognostic factors for CLL / SLL. The selection of cases was carried out retrospectively. The markers used were ZAP70 and CD38 as surrogate markers for the immunoglobulin gene mutation immunogloblinei. The biological material available, paraffin embedded, was the lymphoid tissue from lymph nodes and bone marrow, totaling 35 patients diagnosed with CLL/ SLL in the Oncology Institute "Ion, Chiricuță", Cluj-Napoca in the period January 2004 to December 2006.

Median age at diagnosis was of 60 years. After an average follow-up period of 60 months, 19 patients (54.28%) were deceased at the moment of the statistical analysis. ZAP-70 expression was observed mainly nuclear and neoplastic cells were considered positive in 19 cases (54.28%) and negative in 16 cases (45.71%). Sixteen patients (45.71%) were positive for CD38 and 19 cases (54.28%) were CD38 negative. Regarding the gender distribution men had a better 5-year overall survival compared with women: 65.22% and 50% (log rank $p = 0.16$). Patients with CLL / SLL whose biopsies showed the expression of both markers (ZAP-70⁺CD38⁺ patients) were characterized by an unfavorable clinical outcome compared with patients ZAP-70⁻-CD38⁻. The expression of both markers correlates with a reduced overall survival. The correlation between the IHC expression of the two markers and overall survival was independent of biopsy type (nodal, bone marrow). The study represents the largest series of CLL / SLL tested for the expression ZAP70 and CD38 through immunohistochemical methods on biopsy material originated from lymph nodes and from the bone marrow. The results of this study suggest that the assessment of ZAP-70 and CD38 can be performed on formalin fixed tissue, paraffin embedded, even for bone marrow biopsies.

Study 4. Immunohistochemical prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma

Study 4 is focused on evaluating prognostic factors for DLBCL. Two areas of interest are reached concerning the pathogenesis and prognosis of DLBCL: the classification of cases in the IHC categories: *germinal* and *non-germinal type* and the evaluation of the tumor microenvironment. The division of cases in the immunohistochemical categories mentioned above was based on the algorithm described by Hans et al. Assessment of the tumor microenvironment was performed using the expression of SPARC. The study could not confirm the prognostic value of the Hans algorithm in the context of Rituximab therapy. For the expression of SPARC the study revealed significant differences in overall survival between the different prognostic categories (High, Low, Negative). Moreover there was a linear relationship between the expression of SPARC and the overall survival in the context of rituximab therapy.

GENERAL CONCLUSIONS

The first study analyzed 184 NHL cases diagnosed from 2004 to 2006 in the department of pathology of IOCN. The most common subtype of NHL in this series was DLBCL (43.5%). Among indolent lymphomas, the most common were CLL / SLL (21.2%). Cell lymphomas T / NK-cells occupied a small proportion, 15 cases (8.2%). The most common subtypes were AITL and PTCL-NOS.

Data from North West Cancer Registry showed that the most frequently found subtype of NHL in the northwestern region was CLL / SLL (43%), followed by DLBCL (36%). Follicular lymphoma and T cell lymphomas / NK each accounted for 6% of all cases. We have observed differences between genders in the age-standardized rate of incidence and five years standardized cumulative relative survival, and in particular DLBCL and FL.

We presented a number of cases of Castleman disease with emphasis on clinical, pathology and extensive IHC description used for the final diagnosis of cases. The data presented are consistent with those reported in the literature. The study also pointed IHC role in the differentiation between reactive pathology, potentially malignant evolution, and net malignancy. I believe that by understanding the pathogenesis of precursor lesions will gain a better understanding of the pathways that lead to neoplasia.

Study of ZAP-70 and CD38 expression represents the largest number of CLL / SLL tested by immunohistochemical methods on biopsy material originated at lymphatic and bone marrow. The study revealed significant differences in terms of overall survival by grouping patients according to both express markers: ZAP-70 and CD38. The results of the immunohistochemistry were comparable to the results of studies in the literature have used flow cytometry. The results of this study suggest that assessment of ZAP-70 and CD38 can be performed on tissue fixed in formalin and routinely embedded in paraffin..

DLBCL study included 80 patients diagnosed with DLBCL in the Department of Pathology of IOCN. The group of patients for which I managed immunohistochemical categorization as non-germ or germ included 51 patients. Following patient survival at 5 years we could not confirm the prognostic value of the algorithm described by Hans et al, in the context of rituximab therapy. The algorithm looks to reduce its prognostic capacity as the number of cases assessed decreases.

IHC expression of SPARC study evaluated 39 patients diagnosed with DLBCL. We obtained statistically significant results in terms of overall survival for the three defined categories (high, low, negative). The better survival (50%) was observed in patients who have had a high expression of SPARC in biopsy material ($\geq 15\%$). I was able to confirm the prognostic value of this marker in terms of overall survival at 5 years for patients with DLBCL treated with R-CHOP.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Through this study we tried to bring new evidence regarding the applicability of advances in molecular biology of NHL in everyday practice of the specialty of pathology. It goes without saying that some of the objectives have been studied by other research groups. But I think overall they work to bring information "customized" to our geographic region. This goal was the basis of my thesis because in our region there is a real lack of information on the incidence of NHL.

We conducted the first real population epidemiological study, within the area of interest and NHL. The results showed similar to that reported in the literature, as well as differences. The latter emphasizes the need for large-scale epidemiological studies, because I believe that the observed differences are probably multifactorial.

The use of immunohistochemistry for diagnosis NHL in Romania is an area that can be greatly improved. In this regard I support the idea of introducing practice guidelines for the diagnosis of NHL, which include recommendations on the use of immunohistochemistry. Assessing the costs necessary for immunohistochemical diagnosis is primarily an argument regarding the efficient use of IHC in our country.

One of the counterarguments against the implementation of the latest advances in the study of lymphoid malignancies in our country is the high cost. This in my view not necessarily be seen as an impediment but rather as a challenge to the development of practical techniques with a good cost / quality. Thus the use of TMA as complementary technique IHC is an example that I successfully applied in my research.

There are practical situations and pathologies whose study is limited by the small number of cases. An example is represented by Castleman's disease. The study of this disease was conducted to demonstrate that using a limited number of resources (even limiting myself diagnostic data) can bring solid science. What we hoped to bring to light was the need to effective use of the available resources.

Another example of the use of resources is the study of ZAP-70 and CD38 archived paraffin-based material. The initial results were described using flow cytometry, but we have shown that similar results can be obtained using archived material.

Bearing in mind the efficient use of resources we have demonstrated in this paper that the use of archived material is a solution that brings a sufficient number of cases to achieve statistical significance and low enough cost.

In this paper, we provide new evidence regarding the applicability of advances in the molecular biology of NHL in the everyday practice of pathology. It goes without saying that some of the objectives have been studied by other research groups, but overall they work to bring information "customized" to our geographic region. This was one of the aims of the thesis, because in our region there is a real lack of information on the incidence of NHL. I believe that in the near future the tumor microenvironment will gain influence in the field of NHL, in terms of prognosis and therapy personalization. The tumor microenvironment study falls in the direction of an individualized approach to cases with NHL.