

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**PRINCIPII ȘI METODE DIAGNOSTICE ÎN
LIMFOAME MALIGNNE CU LOCALIZARE O.R.L**

Conducător științific :

Prof. Univ. Dr. ELENA IONIȚĂ

AUTOR:

Dr. SALPLAHTA DANIEL

-2013-

CUPRINS

1. Introducere.....	3
2. Obiective.....	4
3. Materiale și metodă.....	4
4. Rezultate și discuții.....	5
5. Concluzii.....	8
6. Bibliografie selectivă.....	11

Cuvinte cheie : limfom malign NonHodgkin, boala Hodgkin, histopatologie, limfomul difuz cu celulă mare B (DLBCL), Waldeyer, ganglion limfatic, imunohistochimie, anticorpi CD79a, CD20, CD23, CD5, CD10, limfomul zonei de manta, Bcl2, Cyclina D1, Grazina B, Ki67, CD4+, CD24+, Vimentin.

1.Introducere, motivația lucrării.

Limfoamele reprezintă tumori maligne ale celulelor sistemului imun, localizate în diverse țesuturi, ce se deosebesc de leucemii prin absența tabloului leucemic la debutul bolii. Thomas Hodgkin este creditat cu prima recunoaștere a lor, pornind de la observația că limfadenopatia poate fi secundară unei afecțiuni primare ganglionare și nu manifestare a unei infecții sau a unei neoplazii. Inițial diagnosticul era doar clinic, apoi în anii 1900 au apărut primele elemente de histopatologie, în anii '70 s-au dezvoltat tehnicile de imunopatologie, care au permis diferențierea diferitelor subtipuri de limfoame pe baza caracterelor imunopatologice. Anii '80 au adus descoperiri importante în domeniul geneticii moleculare, ceea ce a dus la o mai bună înțelegere a mecanismelor genetice implicate în patogenia limfoamelor. Odată cu dezvoltarea tehnicilor de imagistică medicală de înaltă performanță ca Tomografia Computerizată, Rezonanța magnetică Nucleară, diagnosticul precoce a fost mult înlesnit. Incidența limfoamelor a cunoscut o creștere importantă în ultimii ani, în parte și datorită metodelor moderne de diagnosticare.

În cadrul neoplaziilor O.R.L limfoamele reprezintă o entitate importantă și deosebit de perfidă, prin pauperitatea semnelor de debut. Colaborarea interdisciplinară este deosebit de importantă în diagnosticarea precoce a limfoamelor, care, descoperite la timp, după cum vom vedea, în urma unei terapii corect conduse, au șanse mari de intrare în remisiune completă. Tocmai această evoluție favorabilă și descoperirile recente din domeniul geneticii moleculare m-au determinat să aleg această lucrare, sperând ca prin intermediul acesteia să putem contribui câtuși de puțin la înțelegerea și diagnosticarea acestei maladii redutabile care o reprezintă limfomul.

Medicii specializați ORL sunt frecvent implicați în diagnosticul de limfom. Un sfert din toate limfoamele extrag ganglionare apar la nivelul capului și gâtului. Limfomul este considerat al doilea tip de leziune malignă primitivă care apare la nivelul capului și gâtului. Unele studii consideră că limfomul este o cauză mai frecventă de limfadenopatie cervicală decât boala metastatică. Este important faptul că incidenta limfomului non-Hodgkinian a crescut constant în ultimele decenii.

Limfoamele maligne non hodgkiniene sunt mult mai frecvente decât boala Hodgkin. Aceste limfoame prezintă o gamă largă de subtipuri. Unul dintre cele mai frecvente subtipuri care se întâlnesc la adulți este limfomul difuz cu celule B, care prezintă un grad înalt de agresivitate.

Limfoamele extraganglionare au o predilecție pentru anumite localizări cum ar fi capul și gâtul și aparatul digestiv.

Limfom folicular este și el frecvent întâlnit, dar evoluția sa este mai puțin agresivă, la fel ca limfoamele MALT (Mucosa-associated lymphoid tumor).

2. Obiectivele acestei lucrări au constat în sistematizarea metodelor de diagnostic și stadializare a limfoamelor maligne, un accent deosebit de important fiind pus pe studiul proprietăților imunohistochimice a diferitelor forme de limfoame.

Mi-am propus efectuarea unui studiu retrospectiv pe un lot de 79 pacienți internați în perioada 2000-2011, având următoarele obiective principale:

- Evaluarea pacienților pe baza unui algoritm diagnostic care să includă parametri clinici, biologici, imagistici și examenul histopatologic și imunohistochimic al fragmentelor de biopsie
- Sublinierea particularităților lotului din punct de vedere histopatologic și imunohistochimic, a investigațiilor utilizate în vederea stabilirii diagnosticului
- Folosirea în cercetare a markerilor imunohistochimici în leziunile ganglionare (în cazuri selectate) cu evidențierea unor modificări semnificative și corelarea lor cu aspectele clinice și morfologice;
- Identificarea factorilor de pronostic pe baza caracterelor clinice și imunohistochimice.

3. Material și metodă

Am revizuit cazurile de limfoame non Hodgkin de cap și gât diagnosticate în Clinica de Otolaringologie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova între anii 2000-2011. Toate cazurile studiate au prezentat localizare în sfera ORL. În prealabil pacienții au fost informați și și-au dat acordul asupra utilizării datelor în acest studiu. Din foile de observație au fost înregistrate următoarele informații: vârsta, sex, forma de prezentare, simptome clinice, stadializare, tratament și evoluție. Lotul final de studiu a fost alcătuit din 79 tumori, ce au fost investigate utilizând analiza morfologică (macroscopică și microscopică), metode de biologie moleculară precum și analiza statistică și biomatematică.

În cadrul investigației morfologice de rutină, piesele au fost fixate în formol 10%, incluse la parafină, secționate la microtom cu grosimea de 3-5 micrometri și s-au utilizat colorații standard (hematoxilină-eozină și Giemsa), aplicate tuturor cazurilor studiate, ce au permis gruparea și clasificarea leziunilor în funcție de tipul histologic, precum și aprecierea unor criterii morfologice adiționale

Fixarea a avut ca obiective împiedicarea alterării structurilor celulare și tisulare scoase din organism prin prevenirea fenomenelor de autoliză și pregătirea celulelor și țesuturilor pentru o colorare adecvată. Fixarea a durat 36-48 de ore, la temperatura laboratorului (20 – 25°C), într-un volum de fixator ce a depășit de 10-20 de ori volumul piesei de fixat. După fixare piesele au fost spălate cu apă curgătoare aproximativ 30 de minute.

Aceste fragmente au fost prelucrate în tehnica histologică uzuală la parafină rezultând blocuri de parafină ce conțin fragmente luate în studiu. Incluziunile la parafină au constat în impregnarea și montarea pieselor în parafină. Reacțiile imunohistochimice s-au realizat pe secțiunile de 4 micrometri obținute din blocurile incluse la parafină, care au fost întinse pe lame de sticlă pretratate cu polilizină sau încărcate electric.

Reacțiile imunohistochimice s-au realizat pe secțiunile de 4 micrometri obținute din blocurile incluse la parafină, care au fost întinse pe lame de sticlă pretratate cu polilizină sau încărcate electric.

Sistemul de detecție și vizualizare utilizat a fost kitul EnVision, Dako, Glostrup, Danemarca, o metodă de imunomarcaj bistadial, bazată pe conjugarea unui polimer HRP cu anticorpii secundari. Pentru acest studiu au fost utilizați următorii anticorpi : CD79a, CD20, CD23, DC5, CD10, Vimentin, Bcl12, Bcl16, Cyclina D1, Ki67, GranzinaB, Cytokeratins.

4. Rezultate și discuții

În perioada 2000-2011, în Clinica ORL din Craiova, din totalul celor 26613 pacienți internați, 2165 au fost pacienți diagnosticați cu diferite forme de neoplazii în sfera O.R.L. Pacienții diagnosticați cu limfoame au reprezentat astfel, 0,29% din numărul total de cazuri, respectiv 3.64 % din totalul pacienților neoplazici, o incidență mult crescută față de incidența în rândul populației generale, în special datorită investigațiilor minuțioase a fiecărui caz internat în clinica O.R.L. Deși nu putem discuta despre teste screening propriu-zise, absolut toți pacienții la care s-a ridicat suspiciunea existenței unei neoplazii de orice tip în sfera O.R.L., au beneficiat de avantajele aduse de explorările imagistice de înaltă performanță (ecografie

Doppler, C.T, RMN cu substanță de contrast), fapt ce a dus la diminuarea cazurilor fals negative.

4.1 . În funcție de distribuția pe sexe am identificat un raport bărbați:femei de 0,92 , date ce concordă cu cele din literatura de specialitate. Nu putem afirma că există o diferență statistic semnificativă între sexe.

4.2 Vârsta pacienților incluși în studiu a variat între 28 și 92 ani, cu o medie de 63,08 ani, fără a se identifica diferențe semnificative din punct de vedere statistic între media de vârstă la bărbați și femei. În literatură este descrisă ca vârstă medie de identificare a acestei patologii decada 6 (67 ani) sau decada 7 (71 ani). În studiul nostru, 41,77 % din cazuri au avut vârste sub 60 ani.

LMNH au fost identificate mai rar în primele decade de vârstă, crescând gradat până în decadele 5-8, ce au reprezentat maximul de incidență, pentru ca ulterior să scadă din nou.

4.3 Capul și gâtul reprezintă, după tractul gastro-intestinal, a doua regiune ca frecvență pentru localizarea limfoamelor extraganglionare.

Aproximativ 2,5% din limfoame maligne apar în inelul Waldeyer (de exemplu amigdale, baza nazofaringelui, baza limbii). Distribuția topografică a LMNH a arătat frecvența cea mai mare la nivelul inelului Waldeyer (48% cazuri), în conformitate cu datele din literatură (Kemp, 2008), urmată de ganglioni laterocervicali (34%). Celelalte localizări au prezentat frecvențe mai scăzute: sinonazal (9%), laringe și cavitatea orală 4% și hipofaringe (1%).

4.4 Din punctul de vedere al simptomelor sistemice de însoțire, acestea au lipsit la 31 pacienți și au fost caracterizate prin transpirații nocturne, febră, scădere ponderală cu mai mult de 10% din greutatea corporală la restul de 38 pacienți.

Simptomatologia cel mai frecvent descrisă la pacienții din studiu a fost prezența de limfadenopatii persistente nedureroase (84,81%). Simptomatologia de tip B este mai rar descrisă în asociere cu LNH și a fost identificată în 48,01% din cazuri.

4.4 Din punct de vedere al subtipurilor histologice, am identificat o pondere importantă a limfoamelor de tip B (97,46%). Dintre limfoamele de tip B, cel mai frecvent întâlnit a fost limfomul difuz cu celula mare B (63%), urmat de limfomul folicular (11%), limfomul limfocitic difuz (6%), limfomul MALT și Burkitt (5%), limfom de zona de manta (4%), plasmocitom (3%).

Tipul cel mai frecvent de limfom întâlnit la nivelul capului și gâtului întâlnit în studiul nostru a fost limfomul difuz cu celulă mare B (DLBCL) - 48 cazuri. Numărul cel mai frecvent

de cazuri cu această patologie a fost localizat la nivelul inelului Waldeyer (29 cazuri), urmate apoi de cele localizate la nivelul ganglionilor limfatici (17 cazuri). Alte localizări au fost întâlnite într-un număr redus de cazuri: 4 cazuri la nivel sinonazal și 1 singur caz cu localizare parotidiană.

4.5 Utilizând procedurile standard de stadializare (Ann Arbor) am identificat 12 pacienți în stadiul I, 12 în stadiul II, 15 în stadiul III și 11 în stadiul IV.

4.6 Subtipul cel mai frecvent întâlnit a fost cel centroblastic (37 cazuri), prezentând celule neoplazice similare cu centroblaștii centrilor germinativi reactivi, cu citoplasma redusă amfofilă și nuclei veziculari cu nucleoli dispuși periferic. Varianta imunoblastică , întâlnită în 11 cazuri a fost caracterizat de predominanța unor celule similare imunoblaștilor- celule cu nucleol unic proeminent și citoplasma abundentă bazofilă.

Varianta anaplastică a fost întâlnită în 2 cazuri și a fost caracterizată de prezența unor celule mari, cu pleomorfism marcat.

4.7 Din punct de vedere imunohistochimic celulele neoplazice au exprimat CD20 în toate cazurile, Cd79a în 46 de cazuri și bcl2 , Ki 67 în 13 cazuri.

4.8 Din punct de vedere al localizării am identificat prezența în proporții similare la nivelul inelului Waldeyer (4 cazuri) și la nivelul ganglionilor limfatici în (3 cazuri). Alte localizări au fost întâlnite într-un număr redus de cazuri având 4 cazuri la nivel sinonazal și 1 singur caz cu localizare parotidiană.

4.9 În ceea ce privește limfoamele de tip MALT, acestea au fost întâlnite în 4 cazuri cu localizare în proporții egale la nivelul inelului Waldeyer (1 caz), laringian (1 caz), hipofaringian (1 caz) și la nivelul glandei parotide (1 caz).

Un aspect particular important a fost faptul că limfomul MALT localizat la nivelul glandei parotide a fost identificat la o pacienta tânără aflată în observație pentru sindrom Sjogren.

4.10 Limfomul de zona de manta este un limfom cu celula B întâlnit în studiul nostru în 3 cazuri, localizate la nivelul inelului Waldeyaer (2 cazuri) și ganglionar (1 caz).

În limfomul de manta (3 cazuri) infiltratul limfoid a prezentat aspect difuz, vag nodular, fără prezența de centre de proliferare. Celulele tumorale au fost monotone, cu nuclei cu variate grade de indentare și angulare, cromatina condensată și citoplasma redusă.

4.11 Limfomul Burkitt a fost identificat în 3 cazuri. Aspectul morfologic caracteristic acestor entități a inclus celule de dimensiuni medii, cu nucleu cu nucleol situat paracentral și citoplasma bazofilă, dispuse într-un pater monomorf coeziv. De asemenea au fost identificate numeroase mitoze. Prezența de macrofage dispuse în plajele tumorale a creat aspectul caracteristic de "cer instelat"

4.12 În ceea ce privește limfoamelor NK/T, în studiul nostru au fost identificate 2 cazuri, la pacienți de sex masculin cu vârste de 53 și 57 ani. Patternul histologic a identificat celule mici cu nuclei angulați și cromatina granulară și celule medii/mari cu cromatina granulară și nucleoli vizibili. Proliferarea limfoidă a infiltrat epitelul scuamos, cu prezența de zone întinse de necroză și a fost caracterizată de patternurile de creștere angiocentrică și angiodestructivă. Pentru aceste cazuri s-au efectuat reacții de hibridizare in situ pentru identificarea virusului Epstein Barr (EBV). Pozitivitatea la această reacție a susținut diagnosticul de limfom NK/T deoarece limfoamele cu celule T periferice ce exprimă CD56 sunt adesea EBV negative.

5. Concluzii.

1. Limfoamele capului și gâtului ocupă locul al doilea în cadrul limfoamelor extraganglionare după aparatul digestiv și patogenia lor sunt implicați factori de risc virali (EBV) imunodeficiențe primitive și secundare precum și factori toxici (pesticide).
2. În cadrul lotului de pacienți studiat, analiza histopatologică a pieselor biopsice prelevate de la pacienți a confirmat diagnosticul clinic.
3. Simptomatologia cel mai frecvent descrisă la pacienții din studiu a fost prezența de limfadenopatii persistente nedureroase (84,81%). Simptomatologia de tip B este mai rar descrisă în asocieră cu LNH și a fost identificată în 48,01% din cazuri.
4. Clinic motivele internării la 67 din pacienții incluși în studiu au fost limfadenopatii persistente nedureroase și numai la 12 pacienți a fost descrisă o accelerare a ritmului de creștere a tumorii, însoțită de durere.
5. Simptomele sistemice de însoțire au fost absente la 31 pacienți iar la restul de 48 de pacienți au fost caracterizate prin transpirații nocturne, febră, scădere ponderală cu mai mult de 10% din greutatea corporală.

6. Localizarea cea mai frecventă a fost la nivelul amigdalelor și a ganglionilor laterocervicali și cel mai rar la nivelul laringelui și hipofaringelui.
7. Tipurile histopatologice cel mai frecvent întâlnite au fost: limfom cu celulă mare B difuz (51 de cazuri), folicular 9 cazuri, MALT 4 cazuri, limfom de zonă de manta și limfom Burkitt-like câte 3 cazuri, plasmocitom și limfom NK/T tip nazal câte 2 cazuri.
8. Tipul cel mai frecvent de limfom întâlnit la nivelul capului și gâtului întâlnit în studiul nostru a fost *limfomul difuz cu celulă mare B (DLBCL)* - 51 cazuri. Numărul cel mai frecvent de cazuri cu această patologie a fost localizat la nivelul inelului Waldeyer (29 cazuri. Alte localizări au fost întâlnite într-un număr redus de cazuri (4 cazuri la nivel sinonazal și 1 singur caz cu localizare parotidiană).
9. Pe locul doi ca frecvență s-au situat limfoamele foliculare, cu 9 cazuri. Imunohistochimic, toate cele 9 cazuri au prezentat markeri de linie B pozitivi
10. Vârsta mai mare de 60 ani și un status de performanță clinică prost reprezintă factori de prognostic nefavorabil, chiar asociate cu tipuri histologice cu malignitate joasă.
11. Limfomul cu localizare în cavum are debut insidios, adesea prima manifestare fiind adenopatia laterocervicală. Histopatologic, întâlnim atât forma cu celule B cât și forma cu celule T.
12. Fiecare formă de limfom non-Hodgkin a prezentat aspecte microscopice variate, în fiecare subtip existând un pattern microscopic mai frecvent întâlnit. În toate cazurile arhitectura țesutului limfoid a fost înlocuită de proliferări limfocitare maligne cu caractere microscopice specifice formei de limfom căreia îi aparține.
13. Subtipurile histopatologice de DLBCL au fost: centroblastic (37 cazuri), imunoblastic 11 cazuri, anaplazic (2cazuri), plasmablastic 1 caz.
14. Din punct de vedere imunohistochimic celulele neoplazice au exprimat markerii pan B în aproape toate cazurile(49); CD20 în 48 de cazuri, Cd79a în 50 de cazuri , fenotipuri aberante au fost întâlnite în 2 cazuri; bcl2 a fost pozitiv în 43 de cazuri, Ki 67 a fost pozitiv peste 60% în 39 de cazuri.
15. Limfomul limfocitic difuz a fost identificat în 5 cazuri și caracterizat microscopic de ștergerea difuză a arhitecturii ganglionare, cu prezența în 3 cazuri de infiltrat limfoid hiperchrom punctuat de prezența de focare palide, rotunde, de centri de proliferare. Markerii pan B au prezentat imunoreacție în celulele tumorale, dar CD20 a avut o intensitate mai redusă decât Cd79a. De asemenea am identificat imunomarcaj prezent pentru CD5 și CD23 și absența acestuia la CD20.

16. În ceea ce privește limfoamele de tip MALT, acestea au fost întâlnite în 4 cazuri cu localizare în proporții egale la nivelul inelului Waldeyer (1 caz), laringelui (1 caz), hipofaringelui (1 caz) și glandei parotide (1 caz). Un aspect particular important a fost faptul ca limfomul MALT localizat la nivelul glandei parotide a fost identificat la o pacientă cu sindrom Sjogren.
17. Limfomul de zonă de manta este un limfom cu celula B întâlnit în studiul nostru în 3 cazuri, localizate la nivelul inelului Waldeyer (2 cazuri) și ganglionar (1 caz).
18. Limfomul *NK/T*, în studiul nostru, a fost identificat în 2 cazuri, la pacienți de sex masculin cu vârste de 53 și 57 ani. Imunofenotipul identificat a fost CD2 pozitiv, CD56 și CD3e pozitiv citoplasmatic și TCR negativ.

6. Bibliografie selectivă

1. Airaghi L, Greco I, Carrabba M, Barcella M, Baldini I M, Bonara P, et al. Unusual presentation of large B cell lymphoma: a case report and review of literature. *Clinical and Laboratory Haematology* 2006; 28:338-342.
2. Bogle G, Dunbar PR. T cell responses in lymph nodes. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Jan-Feb;2(1):107-16.
3. C. Frieke Kuper *Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue.. Toxicologic Pathology*, 34:609–615, 2006.
4. Cesta, M. F. (2006) Normal structure, function, and histology of mucosa associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 34, 599–608.
5. De Cicco C, Trifirò G, Ferrari ME, Travaini LL, Calabrese L, Bruschini R, et al. Lymphatic mapping to tailor selective lymphadenectomy in tongue carcinoma cN0: beyond the sentinel node concept. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:900-5.
6. Delgado, J., Matutes, E., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Rafiq-Mohammed, F., del Giudice, I. & Catovsky, D. (2003) Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am J Clin Pathol*, 120, 754-759.
7. Kemp S, Gallagher G, Kabani S, Noonan V, O'Hara C: Oral nonHodgkin's lymphoma: review of the literature and World Health Organization classification with reference to 40 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008,105:194-20.
8. Kolokotronis A, Konstantinou N, Christakis I, Papadimitriou P, Matiakis A, Zaraboukas T, Antoniadis D: Localized B-cell non-Hodgkin's lymphoma of oral cavity and maxillofacial region: a clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005, 99(3):303-10.
9. Raderer M, Streubel B, Woehrer S, Puespoek A, Jaeger U, Formanek M, Chott A. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3349-52.