

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI
Școala doctorală de Științe Biomedicale



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

ROLUL IMPORTANT ȘI LIMITELE IMUNOHISTOCHEMIEI ÎN STABILIREA HISTOGENEZEI TUMORALE

Doctorand,
Anca-Iulia ZANOSCHI (NEAGU)

Conducător științific,
Prof. univ. dr. Aurel NECHITA

Seria M: Medicină Nr. 10

GALAȚI

2024

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI
Școala doctorală de Științe Biomedicale



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

ROLUL IMPORTANT ȘI LIMITELE IMUNOHISTOCHEMIEI ÎN STABILIREA HISTOGENEZEI TUMORALE

Doctorand,

Anca-Iulia ZANOSCHI (NEAGU)

Președinte,

Prof. univ. dr. habil. Dana TUTUNARU, Universitatea „Dunărea de Jos”
din Galați

Conducător științific,

Prof. univ. dr. Aurel NECHITA, Universitatea „Dunărea de Jos” din
Galați

Referenți științifici,

Prof. univ. dr. Iancu Emil PLEȘEA, Universitatea de Medicină și
Farmacie „Carol Davila” din București

Prof. univ. dr. habil. Iuliu FULGA, Universitatea „Dunărea de Jos” din
Galați

Conf. univ. dr. Mariana DEACU, Universitatea „Ovidius” din Constanța

Seria M: Medicină Nr. 10

GALAȚI

2024

CUPRINS

Lista cu abrevieri	III
INTRODUCERE.....	1
Cuvinte cheie	2
Capitolul 1. Patologia tumorală.....	3
1.1. Tumori benigne vs. tumori maligne	3
1.2. Clasificarea histogenetică a tumorilor.....	3
1.3. Gradarea tumorilor maligne (grading-ul).....	4
1.4. Heterogenitatea intratumorală.....	4
Capitolul 2. Histogeneza tumorală	4
2.1. Histogeneza țesuturilor normale	4
2.2. Histogeneza tumorilor.....	4
2.3. Tumori cu histogeneză necunoscută sau incertă	5
2.4. Importanța stabilirii histogenezei tumorale	5
Capitolul 3. Imunohistochimia ca instrument de diagnostic în patologia tumorală.....	5
3.1. Scurt istoric al imunohistochimiei	5
3.2. Principii de bază ale imunohistochimiei	5
3.3. Markerii frecvent folosiți în diagnosticul anatomopatologic	6
3.4. Limite ale diagnosticului imunohistochimic.....	6
3.5. Noi tendințe în imunohistochimie.....	6
Capitolul 4. Metastazele tumorale – o provocare diagnostică	7
Capitolul 5. Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral	9
5.1. Motivația studiului doctoral.....	9
5.2. Scop și obiective	9
6.1. Introducere	11
6.2. Material și metodă.....	11
6.3. Rezultate	12
6.4. Discuții.....	20
6.5. Concluzii	26
7.1. Introducere	27
7.2. Material și metodă.....	27

7.3. Rezultate	28
7.4. Discuții.....	32
7.5. Concluzii	34
Capitolul 8. Studiul predicției diagnosticului histopatologic pe baza markerilor IHC cu ajutorul unui sistem de învățare automată.....	35
8.1. Introducere	35
8.2. Material și metodă.....	36
8.3. Rezultate	37
8.4. Discuții.....	39
8.5. Concluzii	41
Capitolul 9. Concluzii finale, originalitatea tezei doctorale și perspective de cercetare.....	42
BIBLIOGRAFIE.....	45

Lista cu abrevieri

Ac – Anticorp

ADK – adenocarcinom

Ag – Antigen

CK – citokeratină/-e

CSC – carcinom scuamocelular

CT – computer tomografie

H&E – colorația hematoxilină și eozină

HG – de grad înalt (eng. high grade)

IA – Inteligență Artificială

IHC – imunohistochimie / imunohistochimic

LG – de grad scăzut (eng. low grade)

ML – învățare automată (eng. Machine Learning)

MO – microscopie optică

OMS – Organizația Mondială a Sănătății (eng. WHO – World Health Organization)

TM – tumoră malignă

vs. – versus

INTRODUCERE

În perioada modernă, majoritatea țărilor a înregistrat o creștere a cazurilor de cancer, mai ales în ultimele trei decenii. Conform OMS, s-a estimat că în 2020 au fost diagnosticate aproximativ 19,3 milioane de cazuri noi de neoplazii la nivel mondial, iar preconizările sunt că în 2040, povara mondială a cancerului se va ridica la 29,4 milioane de pacienți [1].

În România, conform Institutului Național de Sănătate Publică (INSP), în anul 2019 s-au înregistrat 50312 cazuri de deces prin tumori maligne, incidența fiind de 227,1 la 100000 de locuitori, iar în primul trimestru al anului 2020 s-au înregistrat 14158 cazuri noi de cancer, cu o incidență de 293,8 la 100000 locuitori, numărul total al bolnavilor aflați în evidență oncologică în aceeași perioadă fiind de 491463 [2], [3].

Dacă pacienții ar avea un acces mai bun la sistemele de asistență medicală primară, la programele de screening și la metodele moderne și eficiente de diagnostic, cancerul ar putea fi detectat mai devreme, tratat într-un stadiu incipient și vindecat într-o proporție mai mare. Diagnosticarea corectă a tumorilor reprezintă, probabil, cea mai importantă sarcină a medicului anatomopatolog, jucând un rol de o importanță magistrală în parcursul ulterior al pacientului oncologic.

Atât timp cât tumorile sunt atât de variate și imprevizibile, atât în termeni de morfologie, cât și de comportament, atunci va exista mereu o nevoie clară pentru un diagnostic anatomopatologic bun, bazat în principal pe o atentă examinare în microscopia optică, susținută, acolo unde este necesar, prin tehnici moderne de imunohistochimie (IHC) sau biologie moleculară. În ultimele decenii, au fost descrise în literatura de specialitate o multitudine de noi tipuri sau subtipuri tumorale. Această expansiune rapidă a "bazei de date" a anatomopatologului duce la necesitatea de utilizare de rutină a imunohistochimiei, pentru obiectivarea diagnosticului, dar și pentru a înțelege histogeneza tumorală ori mecanismele patologice. În multe situații, IHC este extrem de importantă pentru stabilirea diagnosticului de certitudine și excluderea diagnosticelor diferențiale, conducând ulterior la alegerea unei anumite conduite terapeutice și la stabilirea prognosticului.

În acest context, alegerea acestei teme pentru teza de doctorat este motivată de necesitatea aprofundării înțelegerii acestei metode diagnostice, dar și de dorința de a îmbunătăți

standardele de diagnostic în patologia tumorală malignă. Totodată, am dorit să fie investigate limitele tehnicii imunohistochemice, pentru reducerea erorilor diagnostice și reducerea variabilității rezultatelor. Prin abordarea acestei teme, ne-am propus să explorăm și să extindem frontierele cunoașterii în patologia tumorală.

Teza de doctorat este structurată în două părți și cuprinde:

- Partea I. Stadiul actual al cunoașterii – include 4 capitole, care însumează 54 pagini, ce cuprind informații teoretice despre patologia tumorală sub aspectul clasificării histogenetice, a heterogenității intratumorale sau a gradării leziunilor neoplazice, despre histogeneza țesuturilor normale și a tumorilor, despre imunohistochimie ca instrument de diagnostic, respectiv despre metastazele tumorale ca provocare diagnostică.
- Partea a II-a. Contribuții personale – structurată în 5 capitole, care totalizează 142 pagini, pe parcursul cărora sunt prezentate scopul și obiectivele generale ale studiului doctoral, apoi sunt detaliate cele trei studii desfășurate, pentru ca în final să fie schițate concluziile generale și perspectivele de cercetare.
- 76 tabele și 52 figuri;
- Bibliografia – însumează 401 referințe bibliografice.

Notă: Prezentul rezumat redă selectiv bibliografia din teză.

Cuvinte cheie

Imunohistochimie, tumori maligne, metastaze, histogeneză, diagnostic histopatologic, markeri, anticorp, antigen, concordanță, predicție, sistem de învățare automată

Capitolul 1. Patologia tumorală

În prezent, neoplazia este definită ca o dereglare genetică a creșterii și multiplicării celulare, declanșată de mutații genetice moștenite sau dobândite, ce afectează o singură celulă sau descendenții clonali ai acesteia. În practica medicală, termenul „tumoră” este utilizat atât pentru a face referire la o proliferare malignă, cât și la o tumoră benignă, în timp ce termenul „neoplazie” este rezervat pentru tumorile maligne, indiferent de linia de diferențiere. Asemănarea celulelor tumorale cu celulele de origine permite de obicei aprecieri asupra tipului tumorii și comportamentului său potențial [4].

1.1. Tumori benigne vs. tumori maligne

Stabilirea caracterului benign sau malign al unei tumori prin examenul histopatologic este de maximă importanță în oncologia umană. Din același țesut pot lua naștere atât tumori benigne, care pot fi periculoase pentru organism prin poziție, comprimarea structurilor vecine, producția excesivă de hormoni sau alte substanțe, cât și tumori maligne ce pun în pericol viața pacientului prin caracterul invaziv și dezvoltarea metastazelor [5].

Printre trăsăturile histopatologice care sunt luate în considerare pentru a distinge tumorile benigne de cele maligne se numără următoarele: gradul de atipie celulară, activitatea mitotică, modelul (pattern-ul) de creștere, invazia, capacitatea de metastazare [4].

1.2. Clasificarea histogenetică a tumorilor

Tumorile compuse dintr-un singur tip de celule sunt clasificate ca epiteliale, mezenchimale, limfoide sau neuroectodermale în funcție de celula de origine. Cele mai multe tumori prezintă caracteristici histopatologice asemănătoare cu celulele omoloage normale și pot fi subclasificate în consecință [6].

În 2004, Jules Berman a încercat să realizeze o clasificare comprehensivă a patologiei tumorale ce păstrează totuși nomenclatura tradițională, bazată însă pe analiza moleculară și dezvoltarea histogenetică, spre deosebire de clasificările tradiționale, ce au la bază doar aspectul morfologic al neoplaziilor [7], [8]. În practica anatomopatologică, cele mai utilizate clasificări sunt cele ale OMS, sub forma unor ghiduri din seria „WHO Classification of Tumours”, ce descriu detaliat subtipurile de tumori ce apar în diferite organe [9].

1.3. Gradarea tumorilor maligne (grading-ul)

Majoritatea schemelor de gradare clasifică tumorile în trei sau patru grade de malignitate crescândă (G1, G2, G3, G4), însă în ultima perioadă, există o tendință de a reduce categoriile de gradare la doar două: de grad scăzut (low grade) și de grad înalt (high grade) pentru anumite categorii de tumori sau localizări. Însă, corelația generală între gradul histologic și comportamentul biologic al unui neoplasm nu este invariabilă: există exemple de tumori de grad scăzut care prezintă proprietăți maligne substanțiale prin capacitatea de invazie a structurilor vecine [10] sau de metastazare [11].

1.4. Heterogenitatea intratumorală

Pe lângă variabilitatea unui tip de tumoră de la o persoană la alta, există variabilitate în ceea ce privește celulele din cadrul tumorii unui singur individ. Dacă un model de mutație aleatorie se aplică evoluției unei tumori solide, mai degrabă decât un model liniar în trepte (în care toate celulele sunt derivate progresiv din progenitori modificați identici), atunci așteptările sunt ca celulele tumorale să fie foarte heterogene [12], [13].

Capitolul 2. Histogeneza tumorală

2.1. Histogeneza țesuturilor normale

Histogeneza reprezintă procesul de dezvoltare a celulelor și țesuturilor din celule nediferențiate, constituate ale celor trei straturi germinative embrionare [14], [15]. Foițele germinative se formează în urma procesului de gastrulație, care are loc în cea de-a treia săptămână a vieții embrionare și sunt reprezentate de endoderm, mezoderm și ectoderm [16].

În urma unei serii de procese bine organizate și integrate, celulele primitive embrionare se diferențiază și își asumă caracteristicile țesuturilor în care se vor dezvolta. Deși morfologia finală a celulelor constituate ale unui țesut poate să nu fie evidentă până când organul în sine nu este bine dezvoltat, mult mai devreme în timpul procesului pot fi detectate reacțiile biochimice specifice, care sunt semnăturile histogenezei [17].

2.2. Histogeneza tumorilor

Sintagma „omnis cellula e cellula ejusdem generis” („toate celulele sunt din celule ca ele”) a fost furnizată de Bard în 1886 și de atunci, în anatomia patologică, termenul

„histogeneză” a fost folosit pentru a desemna posibilul tip de celulă normală din care un anumit tip de tumoră poate apărea [18].

2.3. Tumori cu histogeneză necunoscută sau incertă

Tumorile cu histogeneză necunoscută sau incertă sunt cele pentru care celula omoloagă normală nu a fost încă identificată. Există puține astfel de tumori, majoritatea luând naștere în țesuturi mezenchimale și exprimând totuși o serie de markeri mezenchimali, neuroectodermici sau epiteliali, dar care nu conduc la identificarea celulei de origine [19].

2.4. Importanța stabilirii histogenezei tumorale

Determinarea histogenezei unei tumori este extrem de importantă în oncologie, pentru un diagnostic precis, stabilirea prognosticului și planificarea tratamentului. Înțelegerea histogenezei tumorale contribuie la faptul că pacienții pot beneficia de tratamente personalizate, mai eficiente.

Capitolul 3. Imunohistochimia ca instrument de diagnostic în patologia tumorală

3.1. Scurt istoric al imunohistochimiei

Istoria IHC combină fiziologia, imunologia, biochimia și munca mai multor cercetători, unii laureați ai Premiului Nobel. De la Emil von Behring, câștigătorul primului premiu Nobel pentru medicină și fiziologie din istorie (în 1901), pentru cercetările sale asupra terapiei cu ser în cazul difteriei, la premiul Nobel în 1984 pentru descoperirea anticorpilor monoclonali de către Milstein, Köhler și Jerne, IHC este o poveste de cooperare și colaborare care a dus la dezvoltarea acestei metode moderne, auxiliare tehnicilor histopatologice clasice [20].

3.2. Principii de bază ale imunohistochimiei

Imunohistochimia este un termen „umbrelă” ce cuprinde mai multe metode folosite pentru a determina constituenți tisulari reprezentați de antigene (Ag) cu ajutorul unor anticorpi (Ac) specifici, prin identificarea complexelor Ag-Ac [21].

Unul dintre cele mai importante principii de bază ale IHC este obținerea unei localizări precise a componentelor țintă de la nivel celular sau tisular, pe baza unui raport satisfăcător semnal: zgomot de fond. Amplificarea semnalului cu reducerea concomitentă a zgomotului de

fond (marcajul de fond, nespecific) a devenit o strategie majoră pentru obținerea unui rezultat satisfăcător în acest sens, cu utilitate în practica zilnică [22].

Anticorpii (Ac) sunt molecule proteice, ceea ce face ca aceștia să poată fi și antigene. Tehnicile de IHC se folosesc de această proprietate a anticorpilor, folosindu-i și ca antigene care generează epitopi de care se leagă anticorpii secundari [23]. În imunohistochimie, sunt utilizați atât Ac monoclonali, cât și Ac policlonali, fiecare categorie având avantaje și dezavantaje. Totodată, sunt în prezent încă folosite metode de lucru manuale, cât și echipamente automate.

3.3. Markeri frecvent folosiți în diagnosticul anatomopatologic

În cadrul acestui subcapitol, au fost prezentați în teza de doctorat, peste 100 de markeri IHC dintre cei mai utilizați în practică, fiind grupați în următoarele 14 categorii: markeri epiteliali, melanocitari, mezoteliali, germinali, hematolimofoizi, mezenchimali, neuroendocrini, markeri ai țesutului nervos, factori de transcripție, markeri utilizați în diagnosticul tumorilor mamare, markeri digestivi și hepatici, markeri utilizați în diagnosticul tumorilor urologice și prostatice, alți markeri diagnostici și markeri prognostici.

3.4. Limite ale diagnosticului imunohistochimic

Utilitatea și contribuția imunohistochimiei la obținerea unor diagnostice de certitudine în patologia tumorală sunt influențate de o serie de factori care țin de tehnica utilizată sau de interpretarea rezultatelor. Acești factori au fost analizați în funcție de aceste 2 categorii, dar și în funcție de fazele tehnicii IHC, pentru a fi mai ușor de identificat atunci când sunt responsabili pentru marcaje suboptimale, discordanțe între laboratoare sau erori diagnostice. Pentru a minimiza aceste neajunsuri și limite ale rezultatelor testelor IHC, este necesară impunerea unor standarde de prelucrare a produselor biologice, precum și optimizarea metodelor de lucru în ceea ce privește pașii analitici ai imunohistochimiei, cu sau fără utilizarea automatizării [22], [24].

3.5. Noi tendințe în imunohistochimie

În prezent, sistemele automatizate permit vizualizarea standardizată a țintelor de la nivel tisular cu sensibilitate crescută și cu un semnal îmbunătățit față de fond. Se folosesc și se dezvoltă în continuare tehnicile bazate pe cromogeni, fluorescență și de marcarea cu mai mulți anticorpi (multistaining) [22]. Mai mult, lamele cu imunomarcaje sunt scanate digital și semnalele sunt cuantificate pe baza unor algoritmi de analiză a imaginii. Cererea pentru mai

multe informații de pe aceeași lamă, pentru a conserva țesutul disponibil în blocul tisular, va conduce la utilizarea pe scară mai largă a tehnicilor de multistaining în laboratoare [25]. De asemenea, evoluția este spre evaluare cantitativă în patologia tumorală, care se poate realiza prin utilizarea de kituri și reactivi standardizați, în combinație cu sisteme automate de analiză a imaginilor [26].

Totodată, este explorat potențialul utilizării diverselor metode bazate pe inteligență artificială (IA) și în anatomie patologică, inclusiv în imunohistochimie, pentru a crește precizia diagnosticelor și a scurta timpii de așteptare [27]. Patologia digitală se bazează pe digitalizarea imaginilor preluate prin scanarea lamelor histopatologice sau imunohistochimice, de cele mai multe ori cu obținerea de imagini ale întregii lame (Whole Slide Image, WSI) [28]. Rezultatele unor studii sunt promițătoare și în ceea ce privește folosirea metodelor de învățare automată (Machine Learning, ML) pentru creșterea preciziei, fie prin oferirea unor sisteme de asistare a deciziilor în diagnosticul metastazelor cu punct de plecare neprecizat [29], fie prin oferirea sprijinului în stabilirea grading-ului tumoral, sau în cuantificarea indexului de proliferare Ki67 [30].

Capitolul 4. Metastazele tumorale – o provocare diagnostică

Structura histologică a metastazelor poate fi similară cu tumora primară sau poate fi mai puțin diferențiată. De obicei, probabilitatea ca o tumoră să metastazeze este corelată cu invazia locală agresivă, lipsa diferențierii, rata rapidă de creștere și dimensiunea crescută a formațiunii primare [31], [32].

Cele mai frecvente organe în care apar metastazele de la tumori solide sunt plămâni, ficatul, oasele și creierul, dar pot fi menționate și limfonodulii, glandele suprarenale sau pielea [33], [34].

Metastazele cu punct de plecare neprecizat reprezintă acele metastaze depistate la un pacient la care nu poate fi identificat sediul primar al tumorii, deși au fost realizate o anamneză detaliată, un examen clinic complet, precum și investigații paraclinice extensive [35]. Determinarea tipului și originii tumorilor metastatice este o problemă importantă și potențial dificilă pentru orice anatomopatolog. Situsul tumoral primar poate fi determinat prin corelarea manifestărilor clinice și a investigațiilor imagistice cu aspectele histopatologice ale metastazei,

pe baza cărora se poate alege apoi o serie de markeri imunohistochimici, care reprezintă în majoritatea situațiilor cheia pentru determinarea histogenezei tumorale [36].

Examenul histopatologic este esențial pentru diagnosticul metastazelor cu punct de plecare neprecizat, însă doar examinarea în colorație hematoxilină-eozină este de cele mai multe ori incapabilă să stabilească originea tumorală. Evaluarea microscopică de rutină poate dezvălui caracteristici care sunt patognomonice sau măcar sugestive pentru tipul tumorii (de exemplu, prezența mucinei, a melaninei, a keratinei, producția de bilă etc.). În astfel de situații, pot fi de ajutor colorațiile speciale, însă nici acestea nu pot stabili sediul tumorii primare, ci pot doar confirma prezența unor caracteristici funcționale (de exemplu, secreția de mucus de către adenocarcinoame este pusă în evidență prin colorațiile pentru mucine acide: albastru Alcian, mucicarmin), astfel încât pentru aceste cazuri utilizarea imunohistochimiei devine obligatorie și extrem de utilă [37], [38].

Mai există și situații în care este necesară distincția între caracterul primar sau secundar al unei proliferări tumorale prin teste IHC, de exemplu în cazul adenocarcinoamelor pulmonare slab diferențiate, eventual de mici dimensiuni sau multifocale, deoarece plămânii sunt și sediul frecvent al metastazelor carcinomatoase [39].

În unele cazuri de metastaze cu punct de plecare neprecizat, speciemenle bioptice conțin cantități limitate de celule tumorale, ceea ce subliniază necesitatea unei abordări strategice sau algoritmice a imunomarcajelor, pentru a nu epuiza țesutul tumoral înainte de a obține un diagnostic [40]. În afară de dimensiunile reduse ale țesutului tumoral, mai pot fi considerate impedimente în calea stabilirii originii tumorale și următoarele: artefactele, heterogenitatea intratumorală, numărul crescut de markeri specifici pentru anumite tumori sau nevoia de teste complementare de biologie moleculară [41].

După ce a fost făcut primul pas, reprezentat de confirmarea clasei tumorale (carcinom, melanom, limfom, sarcom, tumoră cu celule germinative, tumoră glială), pentru a încerca să fie depistat sediul tumorii primare, se aplică o serie de markeri în funcție de datele clinice și aspectul histopatologic în colorația uzuală [42].

Astfel, imunohistochimia este o metodă complementară în cadrul anatomiei patologice, extrem de utilă în evaluarea tumorilor metastatice, însă ar trebui utilizată doar în concordanță cu aspectul microscopic și contextul clinic. O abordare sistematică, începând cu evaluarea histomorfologică, urmată de aplicarea algoritmică a unui panel cât mai restrâns de anticorpi sunt

necesare pentru managementul eficient al metastazelor cu punct de plecare neprecizat, ținându-se mereu cont că țesutul inclus la parafină trebuie păstrat judicios și pentru eventuale teste moleculare sau alte teste auxiliare, ce pot oferi noi opțiuni terapeutice [43].

Capitolul 5. Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral

5.1. Motivația studiului doctoral

Diagnosticul precis și rapid al tumorilor maligne este esențial pentru managementul eficient al pacienților oncologici. În contextul diversității biologice a tumorilor, tehnicile histopatologice și imunohistochimice oferă informații valoroase despre tipul, originea și comportamentul acestora. Aceste tehnici complementare sunt esențiale pentru un diagnostic oncologic corect, reducând astfel frecvența adoptării unor tratamente inadecvate.

Progresele în imunohistochimie au deschis noi perspective în diagnosticul patologic, oferind specificitate și sensibilitate superioare. Cu toate acestea, variabilitatea interpretării rezultatelor IHC și necesitatea unei standardizări rămân probleme critice. Pe de altă parte, apariția tehnologiilor bazate pe inteligența artificială oferă oportunități pentru a îmbunătăți acuratețea diagnosticului și a optimiza timpul de eliberare a rezultatelor.

Acestea fiind date, alegerea temei pentru teza de doctorat este motivată de necesitatea aprofundării înțelegerii acestei metode diagnostice, dar și de dorința de a îmbunătăți standardele de diagnostic în patologia tumorală malignă. Totodată, am dorit să fie investigate limitele tehnicii imunohistochimice, pentru reducerea erorilor diagnostice și reducerea variabilității rezultatelor.

Motivația principală a acestui studiu doctoral este de a aborda aceste provocări și de a explora potențialul combinării tehnicilor histopatologice și IHC cu algoritmi de învățare automată pentru a îmbunătăți procesul de diagnostic al tumorilor maligne.

5.2. Scop și obiective

Scopul principal al acestui studiu doctoral este de a evalua importanța și limitele testelor imunohistochimice în stabilirea diagnosticului histopatologic al tumorilor maligne. Prin combinarea perspectivelor histopatologice, imunohistochimice și clinico-epidemiologice, studiul

își propune să ofere o analiză comprehensivă a caracteristicilor tumorilor maligne și a impactului markerilor IHC specifici asupra preciziei diagnosticului pacienților oncologici.

Obiectivele prezentului studiu doctoral au fost:

- Stabilirea lotului de studiu, a criteriilor de includere și de excludere a pacienților și selecția parametrilor de analizat;
- Includerea cazurilor și a parametrilor urmăriți într-o bază de date electronică, pentru o analiză statistică mai facilă;
- Descrierea caracteristicilor socio-demografice ale lotului de studiu;
- Evaluarea diagnosticelor histopatologice obținute după examinarea lamelor în colorație uzuală și cu marcaje imunohistochemice obținute din blocurile tisulare incluse la parafină ale pacienților incluși în studiu;
- Analiza expresiei markerilor imunohistochemici utilizați în diagnosticul diverselor tipuri de tumori maligne primare și metastatice;
- Determinarea ratei de concordanță între diagnosticile stabilite prin colorație H&E și cele confirmate prin IHC;
- Identificarea factorilor care contribuie la concordanța sau discordanțele între diagnosticul în colorație H&E și cel stabilit după efectuarea testelor IHC;
- Identificarea, antrenarea și validarea unui model de învățare automată pentru predicția diagnosticelor histopatologice pe baza markerilor IHC și testarea performanțelor acestuia, pentru a oferi o metodă complementară de luare a deciziilor pentru stabilirea diagnosticelor;
- Formularea concluziilor.

Urmărind atingerea acestor obiective, studiul își propune să contribuie la îmbunătățirea diagnosticului tumorilor maligne și să ofere o bază solidă pentru cercetări viitoare în acest domeniu. Prin combinarea tehnicilor histopatologice și imunohistochemice cu puterea algoritmilor de învățare automată, sperăm ca acest studiu doctoral să aducă contribuții semnificative la creșterea acurateții diagnostice și la optimizarea managementului pacienților cu tumori maligne.

Capitolul 6. Studiul histopatologic și imunohistochemic al tumorilor maligne

6.1. Introducere

În contextul diversității biologice a tumorilor maligne, diagnosticul histopatologic corect și eliberat cât mai rapid este esențial pentru managementul eficient al pacienților oncologici. Examinarea secțiunilor tisulare în colorație uzuală hematoxilină-eozină permite identificarea caracteristicilor morfologice ale tumorilor, iar imunohistochimia adaugă un nivel suplimentar de specificitate și sensibilitate diagnosticelor histopatologice. Aceste tehnici sunt complementare și esențiale în diagnosticul neoplaziilor, oferind informații valoroase despre tipul, originea și comportamentul tumorilor maligne.

Studiul de față îmbină perspective epidemiologice, histopatologice și imunohistochimice pentru a oferi o analiză comprehensivă a caracteristicilor tumorilor maligne, cu scopul de a puncta importanța și limitele testelor imunohistochimice în stabilirea diagnosticului histopatologic. Astfel, ne-am propus să evaluăm relațiile dintre expresia markerilor IHC specifici, diagnosticul histopatologic și caracteristicile clinicopatologice ale tumorilor. De asemenea, prin analiza epidemiologică, dorim să determinăm prevalența acestor tumori în populația studiată, precum și să identificăm posibili factori de risc și tendințe temporale.

Ne bazăm pe presupunerea că integrarea datelor imunohistochimice în protocolul standard de diagnostic histopatologic poate îmbunătăți semnificativ precizia diagnosticelor, reducând astfel frecvența diagnosticelor eronate, ce conduc la atitudini terapeutice inadecvate.

6.2. Material și metodă

Pentru realizarea acestei teze de doctorat, a fost desfășurat un studiu retrospectiv, cu caracter descriptiv, între 1 octombrie 2019 și 31 decembrie 2023. Cazuistica a fost reprezentată de pacienții care s-au adresat Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Sf. Ioan" Galați, pentru realizarea testelor imunohistochimice, în regim ambulator.

Anterior desfășurării studiului, a fost obținut avizul comisiei de etică a spitalului, având numărul de înregistrare C676/20.11.2023, respectând astfel standardele etice impuse de Declarația de la Helsinki revizuită în anul 2013, precum și legislația română în vigoare. Pentru fiecare caz în parte, a fost obținut acordul pacientului informat, care semnaleză consimțământul pentru recoltarea, păstrarea și folosirea probelor biologice în scop diagnostic, dar și științific.

Specimenele analizate au fost reprezentate de blocurile tisulare incluse la parafină, lamele histopatologice în colorație uzuală hematoxilină-eozină (H&E), precum și lamele marcate imunohistochemic cu diverși anticorpi necesari pentru confirmarea diagnosticului.

După aplicarea criteriilor de selecție, s-a constituit lotul format din 686 de pacienți, asupra cărora au fost formulate toate ipotezele și testele ce vor fi redate în cadrul acestui studiu.

6.3. Rezultate

Distribuția lotului în funcție de datele socio-demografice a arătat că majoritatea subiecților au fost de gen feminin, reprezentând 58,02% din total (n=398), cu o concentrație mai mare în mediul urban (n=436), reprezentând 63,56% din numărul de subiecți. În ceea ce privește vârsta pacienților incluși în studiu, extremele au fost de 27 de ani, respectiv 91 de ani, în ambele situații fiind vorba de femei. Majoritatea subiecților incluși în acest lot de studiu au avut vârsta cuprinsă între 51 și 70 de ani (54,52%, n=374), în timp ce 36,59% (n=251) au avut vârsta peste 71 de ani, iar 57 de persoane, reprezentând 8,31%, au avut vârsta cuprinsă între 35 și 50 ani. Cea mai mică pondere de subiecți din cadrul lotului sunt cei cu vârsta cuprinsă între 19 și 34 de ani (0,58%, n=4).

Analizând caracterul primar sau secundar (metastatic) al tumorilor care au fost incluse în lotul de studiu, s-a observat că din totalul de 686 de pacienți, 79,74% (n=547) au avut tumori primare, în timp ce aproximativ de 4 ori mai puțini s-au prezentat cu metastaze (20,26%, n=139).

În ceea ce privește distribuția tumorilor primare și a metastazelor pe ani și trimestre s-a constatat că cele mai multe cazuri au fost diagnosticate în 2021 (n=184), iar trimestrul cu cele mai multe cazuri a fost trimestrul al treilea al anului 2020 (n=60).

Menționând că în cazul a 37,91% din pacienți, nu au fost disponibile date referitoare la investigațiile imagistice efectuate în documentele analizate, pentru restul cazurilor, un rol important l-a avut Computer Tomografia (CT), aceasta fiind singura investigație efectuată în 102 cazuri de tumori primare, respectiv la 68 de pacienți cu metastaze. Din punct de vedere clinic, cei mai mulți pacienți au avut multiple comorbidități (36,63% pentru cei cu tumori primare, respectiv 28,57% dintre cei cu metastaze) sau au fost fără comorbidități (26,92% din cazurile de tumori primare și 20% dintre cei care au fost diagnosticați cu metastaze). În ceea ce privește

istoricul oncologic, doar 16,76% dintre pacienți au avut o tumoră malignă în antecedentele personale.

În ceea ce privește intervenția chirurgicală aplicată, în cazul tumorilor primare, cel mai des au fost efectuate biopsii incizionale sau excizionale, în 40,96% din cazuri, iar cea mai puțin aplicată intervenție a fost microbiopsia, reprezentând 12,39%. În cazul metastazelor, la cei mai mulți pacienți au fost realizate tot biopsii, în 16,62% din numărul de tumori de acest fel.

Dacă analizăm distribuția tumorilor primare în funcție de diagnosticul histopatologic, putem constata că majoritatea pacienților au fost diagnosticați cu adenocarcinoame (n=351, reprezentând 64,29%), în timp ce cel mai mic număr de cazuri au fost cele de tip mezoteliom malign (n=3), reprezentând 0,55% din numărul total de tumori primare care au fost analizate. Un alt tip de tumoră relativ frecventă a fost carcinomul scuamocelular, prezent la 16,48% dintre cei diagnosticați cu tumori primare (n=90).

În mod asemănător, analizând distribuția metastazelor pe categorii de diagnostice histopatologice, se constată că cele mai multe cazuri au fost tot adenocarcinoame (n=99), reprezentând 70,71% din numărul pacienților cu metastaze, iar cel mai mic număr de cazuri au aparținut tot mezoteliomului malign (n=1, reprezentând 0,71% din numărul de metastaze). Totodată, al doilea cel mai frecvent diagnostic a fost tot carcinomul scuamocelular, în 15% din cazurile cu metastaze.

În cadrul întregului lot de pacienți, cele mai frecvente tipuri de adenocarcinoame au fost cele mamare, în special carcinomul mamar invaziv tipul ductal (n=157, adică 34,88% dintre adenocarcinoame). Următoarele subtipuri ca frecvență au fost adenocarcinoamele acinare de prostată (12,22%), adenocarcinoamele pulmonare (10,66%) și adenocarcinoamele de colon convenționale (10%). Cele mai rare adenocarcinoame au fost carcinomul renal papilar și carcinomul de duct salivar, fiecare cu câte 1 caz (reprezentând 0,22% din totalul adenocarcinoamelor).

Din cele 450 de adenocarcinoame diagnosticate în total, 99 au fost sub formă de metastaze, iar dintre acestea, cele mai frecvente au fost metastazele de adenocarcinom pulmonar la nivel pleural și metastazele de carcinom mamar invaziv de tip ductal la nivel limfonodal.

Carcinoamele scuamocelulare (CSC) au reprezentat 16,18% din totalul de cazuri (n=111), dintre care 90 au fost tumori primare și 21 metastaze. Cele mai frecvente CSC primare au avut ca

localizare mucoasa orofaringiană sau laringiană (n=32), urmate de CSC pulmonare (n=18), CSC cutanate (n=17) și CSC de la nivelul colului uterin (n=13). Referitor la metastazele de CSC, cele mai multe cazuri au fost localizate la nivelul limfonodurilor (n=9), iar cele mai puține – la nivel hepatic (n=1).

Analizând markerii IHC care au fost utilizați pentru susținerea diagnosticelor histopatologice, distribuția acestora a fost urmărită în funcție de caracterul primar sau secundar al tumorilor. În ceea ce privește tumorile primare, în funcție de diagnosticul clinic de trimitere, cele mai frecvente au fost tumorile glandei mamare (n=162), reprezentând 29,61% din tumorile primare. În aceste cazuri, Cytokeratin 7 (CK7) a fost pozitiv în toate cazurile în care a fost testat, indiferent de subtip, la fel ca și GATA3, iar markerul p63 a fost negativ în toate cazurile testate, confirmând absența stratului de celule bazale mioepiteliale. Un marker important care a fost testat în absolut toate cazurile a fost E-cadherin, fiind negativ doar în carcinoamele lobulare (confirmând pierderea adeziunii intercelulare) și pozitiv în celelalte subtipuri. Majoritatea tumorilor primare ale sânului incluse în studiu au fost pozitive atât pentru Estrogen Receptor (ER), cât și pentru Progesterone Receptor (PR), doar 15,43% neexprimând ER și 22,84% fiind negative pentru PR. În toate subtipurile de carcinom mamar, în ceea ce privește proporția de pozitivitate atât pentru ER, cât și pentru PR, majoritatea cazurilor au fost încadrate în categoria cu peste 66% din celule pozitive. Majoritatea carcinoamelor mamare (58,02%), indiferent de subtip, au avut indicele Ki67 în categoria 10-30%, urmate fiind de tumorile cu Ki67 înalt, care au reprezentat 35,19%. În ceea ce privește expresia HER2, indiferent de subtipul tumoral, majoritatea cazurilor au fost încadrate în categoria HER2 zero (negativ), însumând 48,76% din totalul tumorilor mamare primare analizate. Cele mai puține cazuri (10,49% din totalul tumorilor mamare primare) au fost de tip echivoc (2+), necesitând suplimentarea cu teste de biologie moleculară pentru a putea stabili dacă expresia HER2 a fost sau nu amplificată. Au fost identificați 20 de pacienți cu tumori mamare primare (reprezentând 12,34%) care au avut expresie 3+ a HER2, iar restul cazurilor (28,39%) au fost încadrate în categoria 1+, care reprezintă o parte importantă a noii clase cu implicații terapeutice, HER2 low.

Următoarele tumori primare ca frecvență au fost cele cutanate (n=56), iar dintre acestea, cele mai multe au fost carcinoame bazocelulare (CBC) în 18 cazuri (reprezentând 32,14%), urmate de carcinoamele scuamocelulare (CSC) cu 17 cazuri (30,9%) și de melanoamele maligne (MM) cu 11 cazuri (20%). Markerii epiteliali p63 și CK5/6 au fost pozitivi în toate cazurile de

CBC și CSC, în timp ce EpCAM a fost pozitiv doar în CBC. Epithelial membrane antigen (EMA) a fost negativ în toate CBC și pozitiv în majoritatea CSC. Markerii melanocitari (S100, Melan-A, HMB45) au fost pozitivi în toate cazurile de MM și negativi în celelalte tumori primare cutanate.

Au urmat ca frecvență tumorile maligne ale prostatei, care au fost prezente la 51 de pacienți, iar în cadrul lotului de studiu, toate aceste tumori au fost avut diagnosticul histopatologic de adenocarcinom acinar de prostată. Niciun caz nu a exprimat markeri pentru celulele bazale mioepiteliale (p63, CK 34 βE12), iar AMACR a fost pozitiv în toate cele 49 de tumori care au fost testate pentru acest marker. Totodată, antigenul specific prostatic membranar (PSMA) a fost pozitiv în toate cazurile în care a fost testat, iar citokeratinele 7 și 20 au fost negative atunci când au fost utilizate pentru diagnostice diferențiale.

În ceea ce privește tumorile primare bronho-pulmoare, acestea au fost următoarele ca frecvență, însumând 42 de cazuri, iar cele mai multe dintre acestea au fost carcinoame scuamocelulare (CSC), diagnosticate la 18 pacienți (reprezentând 42,85%), urmate de adenocarcinoame (ADK) pulmonare prezente la 16 persoane (38,09%), în timp ce carcinoamele neuroendocrine (NEC) au fost depistate la 8 pacienți (19,05%). Tumorile primare pleurale, sub forma mezoteliomelor maligne, au fost prezente la 3 pacienți (7,14%).

Referitor la markerii IHC analizați în cadrul acestor tumori, se poate spune că adenocarcinoamele pulmonare exprimă CK7, TTF1 și Napsin A, fiind negative pentru markerii de diferențiere neuroendocrină (synaptophysin, CD56) și pentru cei exprimați în carcinoamele scuamocelulare (p63, CK5/6). În timp ce alături de calretinin și WT1, mezoteliomelor exprimă și CK5/6, markerul p63 este negativ în aceste tumori. Carcinoamele neuroendocrine, indiferent de morfologia celulară, exprimă Synaptophysin și CD56, iar NEC cu celule mici pot fi pozitive și la TTF1, în timp ce sunt întotdeauna negative la CD45.

Următoarele ca frecvență au fost tumorile maligne ale colonului, rectului și anusului, (40 de cazuri), dintre care marea majoritate au fost adenocarcinoame de colon convenționale (82,5%), în timp ce 12,5% din cazuri au fost adenocarcinoame mucinoase și doar 5% dintre acești pacienți au avut melanoame maligne la nivel anorectal. Citokeratina 20 și CDX2 au fost pozitive la toți pacienții cu ambele subtipuri de adenocarcinoame, în timp ce markerii S100, HMB45, Melan-A au fost pozitivi în melanoame.

Următorul diagnostic clinic de trimitere în ceea ce privește frecvența a fost cel al tumorilor corpului uterin, iar dintre aceste 38 de cazuri, cele mai multe au fost diagnosticate cu carcinoame endometriale endometrioidice (CEE) (n=25, reprezentând 65,79% din tumorile corpului uterin). Celelalte diagnostice histopatologice de la acest nivel au avut câte un număr de cazuri cu valori unitare: 8 carcinoame endometriale seroase (CES) (însemnând 21,05%), 3 carcinoame endometriale cu celule clare (CECC) (adică 7,89%) și 2 leiomiosarcoame (LMS) (5,26%). Markerul epitelial CK7 a fost pozitiv în toate subtipurile de carcinom endometrial, fiind negativ în LMS. Markerul p53 a exprimat pozitivitate nucleară în toate cazurile de CES, fiind neexprimat în CEE și CECC. Receptorii hormonali au fost majoritar pozitivi în CEE și CES, fiind negativi în CECC, iar p16 a fost pozitiv în majoritatea carcinoamelor endometriale. De asemenea, markerii pozitivi în LMS au fost actin și desmin, markerul pentru diferențiere musculară striată, myogenin, fiind negativ.

Tumorile maligne ale capului și gâtului au totalizat 37 de cazuri, dintre care marea majoritate au fost diagnosticate cu carcinom scuamocelular (91,89%, n=34) și doar câte 1 caz cu carcinom de duct salivar, carcinom neuroendocrin cu celule mici, respectiv MM al mucoaselor. Și în această localizare, toate CSC exprimă aceeași markeri epiteliali (CK5/6, p63), MM este pozitiv la S100, Melan-A și HMB45, iar NEC cu celule mici este pozitiv la markerii de diferențiere neuroendocrină (CD56, synaptophysin). În cazul carcinomului de duct salivar, se observă pozitivitatea pentru CK7 și GCDFP-15, precum și negativitatea pentru markerii de diferențiere scuamoasă.

În ceea ce privește patologia tumorală a aparatului reno-urinar, au fost identificate 18 tumori primare, majoritatea la nivelul vezicii urinare (n=14) și doar 4 la nivelul rinichiului. La nivelul vezicii urinare, marea majoritate a cazurilor au fost reprezentate de carcinoame uroteliale invazive, iar un singur caz a avut diagnosticul de carcinom neuroendocrin cu celule mici. În carcinoamele uroteliale, p63, CK34βE12 și GATA3 au fost pozitivi în toate cazurile, iar CK7 și CK20 au fost co-exprimate în majoritatea cazurilor. Au fost identificate 3 carcinoame renale cromofobe și un carcinom renal cu celule clare. CK7 a fost pozitiv în carcinoamele cromofobe, CD10 a fost pozitiv în ambele subtipuri, CD117 doar în cel cromofob, iar vimentin doar în cel cu celule clare. Markerul RCC a fost exprimat în carcinomul cu celule clare, iar în cel cromofob a avut pozitivitate variabilă.

În cazul tumorilor maligne gastrice, au fost identificate 12 cazuri cu ADK gastric convențional (80% din tumorile gastrice primare), 2 cazuri cu carcinom gastric cu celule slab coezive (13,33%) și doar 1 limfom al țesutului limfoid asociat mucoaselor (MALT) (reprezentând 6,67%). Tumorile epiteliale gastrice exprimă atât CK20, cât și CK7, markeri care sunt negativi în limfomul MALT. Mult mai rare au fost tumorile esofagiene, diagnosticate în cadrul lotului de studiu la doar 2 pacienți cu carcinoame scuamocelulare, având expresie similară a markerilor scuamoși ca și în alte localizări (p63, CK5/6 pozitivi).

La nivelul colului uterin, au fost identificate 15 tumori maligne primare, iar 13 dintre acestea au fost CSC, în timp ce doar 2 au fost ADK endocervicale. S-a remarcat pozitivitatea p16 atât în CSC, cât și în ADK endocervicale, precum și pozitivitatea markerilor CK5/6 și p63 în CSC, cu absența expresiei acestora în ADK. Totodată, CK7 a fost pozitiv în toate ADK endocervicale, însă în CSC a fost fie pozitiv, fie negativ.

La nivelul ovarului au fost identificate 10 tumori maligne primare, dintre care 9 au fost carcinoame seroase și doar 1 adenocarcinom mucinos ovarian. Markerii exprimați de carcinoamele seroase ovariene sunt similari celor cu localizare endometrială: CK7 și p53, cu o mai mare variație a pozitivității receptorilor hormonal. În cazul adenocarcinomului mucinos, se remarcă coexpresia CK7, CK20 și CDX2, ceea ce îl diferențiază de metastazele ADK mucinoase colo-rectale, care sunt CK7 negative.

Cele 10 tumori cerebrale primare din lotul de studiu au fost reprezentate de 10 glioblastoame și 2 astrocitoame anaplastice. Markerii GFAP și S100 au fost pozitivi în toate cazurile în care au fost testați, atât în glioblastoame, cât și în astrocitoamele anaplastice, în timp ce EMA și p63 au fost negativi. Proteina p53 a fost pozitivă în 3 cazuri de glioblastoame, iar markerii melanocitari Melan-A și HMB45 au fost negativi.

La nivel hepatic, au fost identificate 8 tumori, jumătate dintre ele fiind carcinoame hepatocelulare (CHC) și jumătate – colangiocarcinoame (CCA), în cadrul cărora citokeratinele au avut profiluri diferite de expresie: CHC au fost negative atât la CK7, cât și la CK20, în timp ce CCA au exprimat CK7, dar nu și CK20, fiind pozitive în schimb la o altă citokeratină, CK19. Markerii pozitivi în CHC au fost HepPar1, CD10 și AFP, iar în CCA, a fost pozitiv CEA și HepPar1 negativ.

La nivelul pancreasului și căilor biliare extrahepatice, au fost diagnosticate doar 3 cazuri, dintre care 2 cu CCA și 1 cu adenocarcinom ductal pancreatic, ambele subtipuri tumorale având

profiluri IHC asemănătoare, cu pozitivitate pentru CK7, EMA, MUC5AC și CEA și negativitate pentru MUC2, cu diferența că CK20 a fost exprimat în CCA și a fost negativ în ADK ductal pancreatic.

Pentru a analiza markerii IHC folosiți pentru a stabili diagnosticul histopatologic al metastazelor, dată fiind heterogenitatea diagnosticelor de trimitere și multitudinea de subtipuri tumorale identificate, a fost luat în calcul în locul diagnosticului de trimitere, țesutul sau organul care au fost biopsiate.

Cele mai frecvente metastaze au fost identificate la nivelul limfonodulilor, în 35 de cazuri. La acest nivel, au fost diagnosticate 10 subtipuri histopatologice diferite ale tumorilor metastazante, iar cele mai frecvente metastaze limfonodale au fost generate de carcinoamele mamare invazive, de tip ductal (n=10, reprezentând 28,57%), urmate îndeaproape de carcinoamele scuamocelulare (n=9, adică 25,71%). Este de remarcă că în cadrul lotului nostru, metastazele la nivelul limfonodulilor de melanom malign (n=4, reprezentând 11,42%) au fost apropiate ca număr de cele date de ADK pulmonar sau de carcinoamele seroase (fiecare cu 8,57%).

În ceea ce privește markerii IHC utilizați pentru tranșarea diagnosticelor, se poate observa că cel mai testat a fost CK7, în 29 de cazuri, fiind pozitiv în 16 dintre acestea (metastaze de la adenocarcinoame pulmonare, carcinoame mamare, carcinoame seroase, ADK ductal pancreatic, carcinom renal papilar) și negativ în restul (metastaze de la carcinoame scuamocelulare, melanom malign, ADK de prostată, ADK de colon, respectiv carcinom neuroendocrin cu celule mici). Următorul marker după frecvența testării a fost CK20, utilizat în 20 cazuri pentru diagnostic diferențial, cu pozitivitate doar în adenocarcinomul de colon.

Următoarele metastaze ca frecvență au fost diagnosticate la nivelul seroaselor (pleurală, peritoneală) sau epiplonului, la 26 de pacienți. Adenocarcinoamele pulmonare au dat cele mai multe metastaze la acest nivel (38,46%), urmate de carcinoamele seroase ovariene (19,23%) și carcinoamele mamare ductale (15,38%). Și în cazul acestei localizări, markerii cei mai testați au fost CK7 și CK20, cu expresie similară ca în cazul tumorilor primare: profil CK7+/CK20- în ADK pulmonare, carcinoamele seroase, carcinoamele mamare, carcinoamele neuroendocrine, ADK de pancreas; profil CK7-/CK20+ în ADK de colon, respectiv profil CK7+/CK20+ în ADK gastric.

Metastazele de la nivel cerebral au fost întâlnite în 13 cazuri din cazuistica analizată, iar aproape jumătate dintre aceste metastaze au fost ale unor ADK pulmonare (n=6), următoarele ca frecvență fiind cele de tip CSC (n=3), diagnostice care au fost confirmate IHC prin profilurile clasice (CK7 și TTF1 pozitivi, iar CK5/6, p63 și markerii neuroendocrini negativi în ADK pulmonar; respectiv CK5/6, p63 pozitivi în CSC).

În ceea ce privește metastazele osoase, acestea au fost identificate la 12 pacienți, jumătate dintre acestea fiind determinate de adenocarcinoame pulmonare, iar un sfert – de carcinoame mamare invazive de tip ductal, iar profilurile de expresie a markerilor IHC ale subtipurilor histopatologice întâlnite la acest nivel sunt similare cu cele având alte localizări.

Următoarele metastaze ca frecvență au fost cele de la nivel pulmonar (n=11), fiind generate cel mai adesea de ADK de colon convenționale și carcinoame mamare invazive de tip ductal (fiecare câte 27,27%). Este de remarcat prezența la acest nivel a 2 metastaze de CSC, la cazuri cunoscute cu tumori primare la nivelul colului uterin, iar în sprijinul datelor clinice, în aceste situații singurul marker IHC care a putut face diferențierea de un CSC primar pulmonar a fost p16, pozitiv.

Un alt sediu important al metastazelor este cel hepatic, în cadrul lotului nostru de studiu fiind prezente 6 metastaze la acest nivel, heterogene din punct de vedere al subtipului histopatologic: doar adenocarcinomul ductal pancreatic a avut 2 cazuri, în timp ce celelalte subtipuri (ADK de colon, tipul convențional, carcinom mamar invaziv de tip ductal, CSC, MM) au fost reprezentate de câte un singur caz, iar markerii cei mai testați au fost CK7 și CK20.

În cadrul lotului de studiu, un marker frecvent testat a fost markerul prognostic Ki67, în 527 din cazuri, valoarea mediană a acestuia a fost 35%, în timp ce cea mai mică valoare a sa a fost 1% și cea mai mare – 90%. Au fost analizați o serie de factori care pot influența valoarea Ki67, iar prin aplicarea testelor ANOVA au fost identificate corelații între valorile acestui marker și următorii parametri: diagnostic histopatologic (p=0.000), grading (p=0.000), pattern histologic (p=0.000) și necroză (p=0.000).

Analizând tabelele de contingență, se mai pot sublinia următoarele: dintre tumorile de grad G1, cele mai multe au avut Ki67 între 10-20% (45,2% dintre acestea), dintre tumorile de grad G2, peste jumătate (51,4%) au avut Ki67 de 21-70%, categorie în care s-au încadrat și majoritatea celor de grad G3 (63,1%) și cele mai multe de grad înalt (44,6%). Tumorile

nediferențiate (G4) au avut într-un procent ridicat (63,6%) un Ki67 între 10-20%, în timp ce majoritatea tumorilor de grad scăzut (LG) au avut Ki67<10% (57,1%).

6.4. Discuții

Studiul de față a arătat o predominanță semnificativă a pacienților de gen feminin (58,02%), comparativ cu cei de sex masculin (41,98%). De asemenea, predominanța feminină se menține constant în ambele medii de proveniență, urban și rural, sugerând că distribuția pe gen nu este influențată semnificativ de mediul de proveniență. În ceea ce privește distribuția pe sexe, un rezultat similar (55% femei) a fost înregistrat de Dong și colab., care au analizat incidența cancerului în SUA între 2011 și 2015, având un lot de peste 14 milioane de pacienți [44]. Huang și colab. [45] au raportat însă o rată pe sexe de 1,04 în favoarea bărbaților, după analiza a peste 14500 cazuri de cancer extrase din The Cancer Genome Atlas database, ce au inclus 38 de tipuri de cancer.

Analiza distribuției lotului pe medii de proveniență a arătat o concentrare mai mare a pacienților în mediul urban (63,56%) comparativ cu mediul rural (36,44%). Aceasta poate reflecta o accesibilitate mai mare la serviciile medicale în mediul urban, o tendință a populației rurale de a migra către orașe pentru îngrijire medicală, dar diferențele pot fi atribuite și stilurilor de viață distincte și expunerii variate la factorii de risc [46]. Aceste rezultate sunt în concordanță cu studiile publicate în diverse țări: Yuan și Xie [47] au arătat o diferență asemănătoare într-un studiu efectuat în China, Thakur și colab. au arătat o incidență de două ori mai mare în mediul urban nordul Indiei [48], iar în SUA, conform „National Cancer Institute (NCI)” [49], se poate observa aceeași diferență ca și în studiul nostru.

Majoritatea subiecților incluși în studiu au avut vârsta cuprinsă între 51 și 70 de ani (54,52%), urmată de grupa de vârstă peste 71 de ani (36,59%). Această distribuție arată o incidență mai mare a tumorilor studiate în rândul populației mai în vârstă, ceea ce este în concordanță cu literatura de specialitate. Conform „NCI’s Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program” [49], vârsta medie la care se diagnostichează cancerul este 66 ani.

Studiul de față a arătat că 79,74% dintre pacienți au avut tumori primare, în timp ce 20,26% au prezentat metastaze, iar analiza pe grupe de vârstă arată că acestea sunt cel mai frecvent întâlnite în rândul pacienților cu vârsta între 51 și 70 de ani. Este important de menționat că, în cazul pacienților tineri (19-34 ani), nu au fost identificate metastaze. Analiza distribuției

cazurilor pe ani și trimestre a evidențiat o fluctuație a numărului de cazuri. Anul cu cele mai multe cazuri diagnosticate a fost 2021, cu o incidență crescută în trimestrul al treilea al anului 2020. Rezultatele studiului indică necesitatea unor politici de sănătate publică axate pe prevenție și diagnostic precoce, în special în rândul populației mai în vârstă și a femeilor. De asemenea, ar fi utilă o investigație suplimentară a factorilor de mediu și comportamentali care pot influența distribuția socio-demografică a afecțiunilor studiate. Este important să se continue monitorizarea și analiza datelor pentru a identifica tendințele și a adapta strategiile de intervenție în funcție de acestea.

Analizând rezultatele referitoare la investigațiile imagistice sau endoscopice realizate pentru diagnosticarea tumorilor, Computer Tomografia a fost cea mai frecvent utilizată investigație atât pentru tumorile primare cât și pentru metastaze, subliniind importanța CT-ului în stabilirea unui diagnostic în patologia tumorală. Lipsa informațiilor despre investigațiile realizate în 37,91% din cazuri indică o necesitate de standardizare a completării documentelor medicale pentru a obține un diagnostic cât mai complet, în context multidisciplinar.

Datele privind comorbiditățile arată că o mare parte a pacienților prezintă multiple afecțiuni asociate, ceea ce poate complica managementul clinic al acestor cazuri. Mai exact, 36,63% dintre pacienții cu tumori primare și 28,57% dintre cei cu metastaze au avut multiple comorbidități. Această prevalență ridicată a comorbidităților necesită o abordare holistică în îngrijirea pacienților oncologici, având în vedere complexitatea tratamentului și impactul asupra calității vieții pacienților. Rezultatele studiului de față sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate, care indică că asocierea de mai multe comorbidități este observată în mod regulat în populație [50], [51] și reprezintă o provocare pentru sistemele de sănătate, în special pentru cele orientate spre gestionarea unei singure boli [52], [53]. Ghidurile clinice din România nu sunt adaptate impactului cumulativ al recomandărilor de tratament asupra persoanelor cu multiple morbidități și nu facilitează o comparație a potențialelor beneficii sau riscuri, ca și în alte țări [54].

Rezultatele acestui studiu referitoare la diagnosticele histopatologice oferă o imagine detaliată asupra distribuției tumorilor în funcție de categoriile și subtipurile tumorale, subliniind predominanța adenocarcinoamelor în cadrul întregului lot de studiu. Distribuția adenocarcinoamelor în cadrul lotului a arătat că acestea reprezintă majoritatea cazurilor atât la nivelul tumorilor primare (64,29%), cât și la nivelul metastazelor (70,71%). Cele mai frecvente

subtipuri de adenocarcinoame au fost carcinoamele mamare invazive de tip ductal, ADK acinare de prostată, ADK pulmonare și cele de colon convenționale. Carcinomul scuamocelular a fost al doilea cel mai frecvent tip de tumoră, reprezentând 16,48% din cazurile de tumori primare, cu localizare frecventă la nivelul mucoasei orofaringiene și laringiene, precum și la nivelul pielii și colului uterin și 15% din cazurile de metastaze. Aceste descoperiri sunt în concordanță cu literatura de specialitate, care indică adenocarcinoamele ca fiind cele mai comune tipuri de tumori maligne în rândul populației studiate. Li și colab. [55] au găsit într-un studiu retrospectiv efectuat pe 23674 de cazuri din China de nord, o rată de 34,3% a adenocarcinoamelor, urmată de carcinomul scuamocelular cu 14,5%, iar studii din Statele Unite ale Americii, Coreea și Australia, au observat prevalențe asemănătoare acestui studiu [56]–[58].

În contrast cu ADK și CSC, alte tipuri de tumori precum mezoteliomul malign și anumite subtipuri de adenocarcinoame (de exemplu, carcinomul renal papilar și carcinomul de duct salivar) au fost mult mai rar întâlnite. Mezoteliomul malign este o tumoră relativ rară, care poate imita leziuni mezoteliale benigne și numeroase alte tipuri de cancer, ceea ce face ca identificarea bolii să fie dificilă [59], [60], diagnostiarea sa devenind provocatoare pentru medicul anatomopatolog. Confirmarea unui diagnostic de mezoteliom necesită utilizarea corectă a unui panel de markeri IHC, opțiune care este adesea indisponibilă în serviciile cu venituri mici [61]. Carcinomul renal este o tumoră insidioasă, reprezentând aproximativ 2% din diagnosticile și decesele de cancer la nivel global, dar a cărei prevalență se preconizează că va crește la nivel mondial, iar varianta sa papilară este și mai rară, constituind 15-20% din toate carcinoamele renale [62]. Carcinomul de duct salivar este o tumoră extrem de rară, cu o incidență anuală estimată de 1-1,2 la 1.000.000 de pacienți, având o prevalență mai mare la bărbați, iar Adeberg și colab. [63] au identificat doar 1282 de cazuri în literatura de specialitate între 1987 și 2019. Această raritate subliniază importanța diagnosticării corecte și a gestionării specializate a acestor cazuri, dat fiind faptul că tratamentele și prognosticul pot varia considerabil față de tumorile mai comune.

Stabilirea diagnosticului histopatologic corect prin utilizarea testelor imunohistochimice a fost esențială în acest studiu. Corelația între aspectele morfologice și rezultatele imunohistochimice a permis o clasificare precisă a tumorilor. S-a evaluat expresia markerilor imunohistochimici în cadrul diverselor tipuri de tumori primare și metastatice, evidențiind importanța acestora în stabilirea unui diagnostic precis.

În cazul tumorilor primare, cele mai frecvente au fost cele mamare, prostatice, bronho-pulmonare, colo-rectale, uterine, precum și cele ale capului și gâtului. Pentru tumorile glandei mamare, markerii CK7 și GATA3 au fost pozitivi în toate cazurile testate, E-cadherin a fost negativ în carcinoamele lobulare și pozitiv în cele ductale, iar p63 a fost negativ în toate cazurile. Studii mai vechi au arătat că expresia GATA3 este strâns legată de expresia Estrogen Receptor, cu o sensibilitate relativ scăzută în toate carcinoamele invazive de sân (<50%) utilizând clona HG3-31 [64], [65]. Cu toate acestea, utilizând o clonă diferită a GATA3, L50-823 (care a fost utilizată și în studiul nostru), studii ulterioare au demonstrat o sensibilitate ridicată (>90%) a expresiei GATA3 în carcinoamele mamare invazive primare și metastatice [66], [67]. În carcinoamele invazive de sân ER pozitive, sensibilitatea expresiei GATA3 este de până la 100% [68]. Numeroase studii au investigat expresia proteinei E-cadherin în carcinomul lobular și ductal și au relevat o pierdere completă a expresiei E-cadherinei în majoritatea cazurilor de carcinom lobular, în contrast cu colorarea membranară difuză în majoritatea cazurilor de carcinom ductal. Cu toate acestea, expresia aberantă a E-cadherinei a fost identificată în cazuri ocazionale de carcinom lobular, fiind raportată într-un interval de 2% până la 16% [69], [70].

În cazul tumorilor cutanate, markerii p63 și CK5/6 au fost pozitivi în CBC și CSC, în timp ce markerii melanocitari (S100, Melan-A, HMB45) au fost pozitivi în toate cazurile de melanom malign. Qureshi și colab. [71] au sugerat că CK5/6 și p63 sunt utile pentru a distinge neoplasmele primare de anexe cutanate de metastazele cutanate ale adenocarcinoamelor cu diverse origini primare, cu excepția carcinomului mucinos cutanat primar. Studii efectuate pe șoareci au demonstrat că expresia CK5/6 este într-un fel controlată de p63 [72], [73]. Acest lucru nu este surprinzător, deoarece studiile in vitro folosind keratinocite umane transformate au arătat că p63 este un factor de transcripție nuclear care declanșează expresia markerilor de diferențiere keratinocitară [74]. Conform Ohsie și colab. [75], S100 rămâne cel mai sensibil marker pentru tumorile de origine melanocitară, cu sensibilități raportate de 97-100%. De asemenea, trebuie reținut faptul că pierderea pozitivității pentru S100 în melanom poate apărea în arii extinse de necroză [76]. Conform studiilor din literatura de specialitate, HMB45 are o sensibilitate cuprinsă între 72% și 100% în melanomele primare și scade de la 95% la 58% în leziunile metastatice, în timp ce specificitatea este de aproximativ 91-100% pentru melanocite față de celulele non-melanocitare [77], [78]. În cazul melanoamelor metastatice, asocierile markerului S100 cu doi

sau mai mulți markeri specifici, cum ar fi HMB45 și Melan-A [79], ar putea oferi informații obiective și de încredere despre progresia bolii.

Pentru tumorile maligne prostatice, markerii p63 și CK34βE12 au fost negativi, confirmând absența celulelor bazale, iar AMACR și PSMA au fost pozitivi în majoritatea cazurilor. Există în literatura de specialitate și discrepanțe privind expresia markerilor pentru celule bazale în adenocarcinoame și în leziuni non-invazive. Multhaupt și colab. au constatat că 88% din glandele benigne din zona de tranziție, obținute prin rezecție transuretrală de prostată (TUR-P), au pierdut antigenicitatea CK34βE12 dacă o metodă eficientă de recuperare antigenică nu a fost utilizată [80]. Mai multe studii au constatat adenocarcinoamele prostatice, în special cele slab diferențiate, pot păstra expresia markerilor pentru celule bazale, CK34βE12 și p63 [81], [82], fiind cel mai probabil o expresie aberantă a acestor markeri. Studii variate au constatat că sensibilitatea AMACR ca marker specific pentru adenocarcinomul prostatic variază între 80% și 100% [83], [84]. Într-o metaanaliză care a inclus 22 de studii cu 4385 de participanți, Jiang și colab. [85] au demonstrat că expresia pozitivă a AMACR în țesutul prostatic este asociată cu o probabilitate mai crescută a unui diagnostic de cancer de prostată.

În cazul tumorilor bronho-pulmonare, adenocarcinoamele au exprimat CK7, TTF1 și Napsin A, iar carcinoamele neuroendocrine au fost pozitive la Synaptophysin și CD56. Deși CK7 a fost utilizat timp de decenii pentru a identifica adenocarcinoamele pulmonare, sensibilitatea și specificitatea sa suboptimale sunt bine cunoscute [86], [87]. În literatura de specialitate, sensibilitatea și specificitatea TTF1 în identificarea originii pulmonare a adenocarcinoamelor variază și se situează între 75% și peste 95%; totodată, TTF1 este pozitiv și în alte tumori, precum cele tiroidiene sau carcinoamele cu celule mici, pulmonare [88]–[90]. Studii folosind specimene rezecate chirurgical au indicat că Napsin A are o sensibilitate și specificitate mai bune decât TTF1 în adenocarcinoamele pulmonare bine și moderat diferențiate [91], [92]. Prin urmare, acest marker poate fi utilizat împreună cu TTF1 în diagnosticul diferențial al adenocarcinoamelor pulmonare [93]. Mai mult, a fost demonstrat că Napsin A poate fi deosebit de util și în adenocarcinoamele slab diferențiate, care pot pierde expresia TTF1 [94]. Curioni-Fontecedro și colab. [95] au analizat eficacitatea markerilor neuroendocrini în studiul lor și au constatat că Synaptophysin și Chromogranin sunt mai sensibile în carcinoid comparativ cu carcinomul neuroendocrin cu celule mici. Expresia CD56 a fost investigată de către Wang și colab. [96], ca factor prognostic la pacienții cu carcinom neuroendocrin cu celule

mici, iar atât CD56, cât și Synaptophysin au fost asociate cu un prognostic nefavorabil la pacienții cu carcinom pulmonar non-microcelular [97].

Tumorile colo-rectale au fost în principal adenocarcinoame convenționale și mucinoase, cu CK20 și CDX2 pozitive în toate cazurile testate. Cel mai comun imunofenotip al adenocarcinomului colorectal este pozitivitatea pentru CK20 și negativitatea pentru CK7, care reprezintă un model de colorare relativ specific pentru originea colorectală a tumorii [98]. Totuși, având în vedere că a fost raportat că până la 20% dintre tumori pot prezenta un model de colorare CK7 pozitiv/CK20 negativ sau CK7 negativ/CK20 negativ [99], de cele mai multe ori mai este nevoie de încă un marker pentru confirmarea originii colo-rectale. Werling și colab. [100] au arătat că CDX2 este un foarte bun marker al diferențierii enterice și este pozitiv în peste 90% din adenocarcinoamele colorectale, iar Vang a arătat o heterogenitate mai mare a colorării intratumorale CDX2 în rândul adenocarcinoamelor de origine extraintestinală [101].

Markerii p63, p16 și CK5/6 au fost pozitivi în carcinoamele scuamocelulare ale colului uterin, iar CK7, WT1 și p53 au fost pozitivi în carcinoamele seroase ovariene. O rată de pozitivitate înaltă, de 98,6%, a markerului p16 în CSC cervicale Tan și colab. [102]. Li și colab. [103] au constatat că o combinație de CK5/6 cu p40 sau p63 crescut specificitatea (98,15%, respectiv 96,30%), crescând acuratețea diagnosticării carcinomului scuamocelular în tumorile de col uterin. Köbel și colab. [104] afirmă că expresia WT1 este înalt sugestivă pentru carcinoamele seroase ovariene de grad înalt, doar aproximativ 10% dintre aceste tumori putând fi negative pentru acest marker. În ceea ce privește expresia p53, rezultatele studiului nostru sunt similare cu cele literatura de specialitate, existând studii care au identificat expresie pozitivă la nivel nuclear a p53 în aproape 100% din carcinoamele seroase ovariene high-grade [105], [106].

Metastazele au fost identificate cel mai frecvent la nivelul limfonodulilor, seroaselor și epiplonului, precum și la nivel cerebral și osos. Metastazele limfonodale au fost determinate majoritar de carcinoamele mamare invazive și carcinoamele scuamocelulare, cu CK7 pozitiv în majoritatea adenocarcinoamelor și CK20 pozitiv doar în adenocarcinomul de colon. Metastazele la nivelul seroaselor și epiplonului au provenit în principal de la adenocarcinoame pulmonare și carcinoame seroase ovariene, cu testarea frecventă a CK7 și CK20. Metastazele cerebrale au fost în principal reprezentate de adenocarcinoame pulmonare (CK7 și TTF1 pozitive) și carcinoame scuamocelulare (CK5/6, p63 pozitive), iar în cazul lor GFAP a fost utilizat pentru diagnostic diferențial cu tumorile cerebrale primare.

Analiza markerului Ki67 în cadrul lotului de studiu a arătat o valoare mediană de 35%, cu variații între 1% și 90%. Aplicarea testului ANOVA a indicat diferențe semnificative ale valorilor Ki67 în funcție de diagnosticul histopatologic ($p=0.000$), ceea ce sugerează că diagnosticul histopatologic influențează semnificativ valorile Ki67. Într-o meta-analiză a 71 de studii din perioada 1990-2010, Ki67 s-a dovedit a fi un factor prognostic independent pentru supraviețuirea fără boală în cancerul mamar, iar cele mai mari beneficii de pe urma evaluării Ki67 au putut fi observate la pacienții cu receptori de estrogen pozitivi [107].

Grading-ul tumorilor a demonstrat, de asemenea, un efect semnificativ asupra valorilor Ki67 ($p=0.000$), indicând că valorile mai mici ale Ki67 au fost asociate cu grading-uri mai bune (G1, LG), în timp ce valorile mai mari ale indicelui de proliferare au fost corelate cu tumori mai puțin diferențiate (G3, HG). Un studiu similar realizat pe pacienți cu cancer mamar din Sudan a relevat o asociere semnificativă a indicelui Ki67 cu grading-ul tumoral, însă nu a reușit să evidențieze nicio asociere semnificativă a Ki67 cu receptori hormonal, dimensiunea tumorii și stadiul bolii [108].

Similar, analiza pattern-urilor histologice a relevat diferențe semnificative între valorile Ki67 ($p=0.000$), subliniind influența tipului de pattern histologic asupra activității proliferative a tumorii. Evaluarea influenței necrozei asupra Ki67 a confirmat o corelație între prezența necrozei și proliferarea celulară crescută ($p=0.000$).

6.5. Concluzii

Studiul prezentat oferă o perspectivă valoroasă asupra distribuției socio-demografice și caracteristicilor tumorilor în rândul subiecților analizați, evidențiind importanța unei abordări multidisciplinare pentru îmbunătățirea diagnosticelor histopatologice. Compararea rezultatelor studiului de față cu alte cercetări în domeniu subliniază importanța contextului local în interpretarea datelor epidemiologice. Diferențele în distribuția pe sexe, medii de proveniență și tipuri de cancer evidențiază necesitatea unor strategii personalizate de prevenție și tratament. Similaritățile, pe de altă parte, oferă validare externă constatărilor noastre și arată tendințele globale în epidemiologia cancerului.

Totodată, este subliniată importanța utilizării corecte și complete a investigațiilor imagistice și a tipurilor de intervenții chirurgicale în diagnosticarea și managementul tumorilor.

De asemenea, este reliefată necesitatea unei documentații medicale complete și a unei abordări interdisciplinare pentru a gestiona complexitatea cazurilor cu multiple comorbidități.

Studiul de față subliniază importanța cunoașterii distribuției histopatologice a tumorilor maligne, pentru o mai bună gestionare a cazurilor. Markerii IHC sunt esențiali pentru stabilirea unui diagnostic histopatologic precis, identificând originea și subtipul tumoral, ceea ce este esențial pentru planificarea tratamentului adecvat.

Markerul Ki67 este un indicator important al proliferării tumorale, influențat semnificativ de diagnosticul histopatologic, grading, patternul histologic și prezența necrozei. Acești factori trebuie considerați în evaluarea și tratamentul pacienților cu tumori pentru o abordare diagnostică și terapeutică optimizată.

Capitolul 7. Studiul concordanței între diagnosticul histopatologic în colorație H&E și cel stabilit după teste IHC

7.1. Introducere

Studiul concordanței între diagnosticul histopatologic în colorație hematoxilină-eozină și cel stabilit după efectuarea testelor IHC reprezintă un demers esențial pentru evaluarea acurateței diagnosticului de certitudine în patologia tumorală. Examenul microscopic în colorație H&E, o tehnică standard utilizată pe scară largă în practica anatomopatologică, oferă informații valoroase despre morfologia tisulară și celulară. Cu toate acestea, în anumite cazuri, poate exista o variabilitate semnificativă în interpretarea acestui diagnostic, ceea ce poate conduce la discordanțe comparativ cu diagnosticul stabilit ulterior prin teste IHC, care utilizează markeri specifici pentru a evidenția caracteristicile moleculare ale țesutului tumoral.

7.2. Material și metodă

Pe parcursul realizării studiului redat în capitolul 6, atunci când s-au analizat diagnosticele histopatologice stabilite doar în colorație H&E în serviciul de anatomie patologică unde a fost prelucrat țesutul prelevat de la fiecare pacient, s-au constatat o serie de discordanțe între aceste diagnostice și cele stabilite după ce au fost efectuate testele IHC în serviciul nostru, dar și multiple cazuri cu concordanță totală.

Astfel, pentru a putea analiza factorii care au contribuit la apariția discordanțelor dintre diagnostice, am considerat oportun să fie realizat un studiu retrospectiv analitic, în aceeași

perioadă 1 octombrie 2019 – 31 decembrie 2023, incluzând toți cei 686 pacienți, pornind de la baza de date folosită la studiul prezentat anterior și introducând noi variabile.

Au fost încadrate situațiile descoperite în 5 categorii referitoare la concordanța între diagnostice, după cum urmează: concordanță totală și 4 tipuri de discordanțe (cu privire la subtipul tumoral, cu privire la grading, cu privire la originea tumorii primare și discordanță totală).

7.3. Rezultate

În cadrul lotului de studiu, cele patru categorii de discordanță între diagnostice au însumat 52,8% din cazuri, în timp ce diagnosticele total concordante au fost stabilite în 47,2% din cazuri. Discordanța cu privire la subtipul tumoral și cea totală au avut cele mai mari procente dintre discordanțe, de 16,6%, respectiv 16,3%, urmate de discordanța cu privire la grading (14,7%). Discordanța cu privire la originea tumorii primare a fost întâlnită în 5,1% din cazuri.

În ceea ce privește cele mai frecvente subtipuri tumorale din cadrul fiecărei categorii de concordanță în parte, s-a observat că în toate categoriile de concordanță, este prezent carcinomul mamar invaziv, tipul ductal, dat fiind că a fost și cel mai frecvent subtip tumoral în cadrul întregului lot (157 cazuri). Acest subtip tumoral a fost încadrat cel mai frecvent în cadrul categoriei concordanță totală (n=88 cazuri), unde este situat pe primul loc ca frecvență, așa cum a fost situat și în cadrul discordanței cu privire la grading (n=35) și a celei cu privire la subtip (n=23), iar frecvențe mai mici au fost înregistrate în cazul discordanței totale și a celei cu privire la originea tumorii primare. Un alt diagnostic histopatologic frecvent întâlnit în cadrul acestor categorii a fost carcinomul scuamocelular, ce a reprezentat 18,2% din cazurile cu concordanță totală, 17,8% din discordanțele cu privire la grading, 16,9% din discordanțele totale, respectiv 13,2% din discordanțele cu privire la subtip. Un alt subtip frecvent în cadrul lotului de studiu a fost adenocarcinomul acinar de prostată (n=54), care a reprezentat 7,1% din concordanțele totale, 18,8% din discordanțele cu privire la grading, respectiv 11,4% din discordanțele cu privire la originea tumorii primare. Adenocarcinomul pulmonar a fost cel mai frecvent în cadrul categoriei de discordanță cu privire la originea tumorii primare (34,3%), iar în cazul discordanței totale a întrunit același număr de cazuri ca și CSC (n=19, reprezentând 16,9%), în timp ce în cadrul discordanței cu privire la subtip a avut aceeași frecvență ca și carcinomul seros (9,6%).

Analiza factorilor care pot influența concordanța dintre diagnostice a început cu evaluarea relației dintre modul de obținere a eșantionului tisular necesar pentru stabilirea diagnosticului histopatologic și categoriile de concordanță. În ceea ce privește majoritatea eșantioanelor tisulare (cele obținute prin biopsii incizionale sau excizionale), concordanța totală a fost înregistrată în 44,3% din cazuri, iar discordanța totală – în 20,3%. Raportând aceste două frecvențe la celelalte tipuri de eșantioane tisulare, se remarcă faptul că în cazul biopsiilor, concordanța totală are procentul cel mai mic (față de 52,1% în cazul microbiopsiilor, respectiv 50,8% în cazul rezețiilor), iar discordanța totală are procentul cel mai mare (față de 7,4% în cazul microbiopsiilor, respectiv 12,7% în cazul rezețiilor). Discordanța cu privire la subtipul tumoral și cea cu privire la grading sunt distribuite mai uniform între tipurile de eșantioane tisulare. Discordanța cu privire la originea tumorii primare a fost întâlnită într-un procent mai mare în cazul biopsiilor (7,6%) față de celelalte tipuri de eșantioane. Aplicarea testului Chi-pătrat asupra variabilelor concordanță și eșantion tisular a arătat că există o corelație între acestea, semnificativ statistică ($p=0.001$).

Artefactele de prelucrare histopatologică pot avea un impact important asupra calității blocurilor tisulare incluse la parafină și a secțiunilor obținute din acestea, cu alterarea morfologiei tisulare, iar ele apar de cele mai multe ori din cauza suprafixării în formol sau a subfixării, mai rar din cauza deshidratării incomplete a țesuturilor. Totodată, mai sunt de menționat și artefactele de electrorezeție și de electrocoagulare din timpul prelevării probei tisulare, ce pot conduce la distorsiuni ale țesuturilor și pierderea detaliilor celulare. În cadrul lotului de studiu, prezența acestor artefacte a fost raportată în 11,2% din cazuri, însă testul Chi-pătrat nu a identificat o corelație între artefacte și concordanță ($p=0.995$).

La evaluarea microscopică, 25,8% din totalul tumorilor au avut prezentă necroza tumorală, în timp ce în majoritatea cazurilor (74,2%) nu a fost identificat acest aspect. În cadrul lotului, cele mai multe cazuri au fost cele la care necroza nu a fost prezentă și a fost înregistrată concordanță totală între diagnostice (36,2%), în timp ce cele mai puține cazuri au fost încadrate ca având necroză și discordanță cu privire la grading (2,2%). Referitor la concordanța totală, se remarcă faptul că există o diferență procentuală relativ mică între cazurile în care nu a fost prezentă necroza (48,7%) și cele în care aceasta a existat (42,9%), iar în ceea ce privește discordanța totală, situația este similară, dar în favoarea cazurilor cu necroză (21,5%) față de cele

cu absența necrozei (14,5%). Testul Chi-pătrat a identificat o corelație cu semnificație statistică ($p=0.000$) între variabilele necroză și concordanță.

Pentru a analiza relația dintre pattern-ul histologic și categoriile de concordanță, am grupat cele mai întâlnite modele de creștere și am redat frecvența acestora în cadrul lotului de tumori studiate. Asocierea mai multor pattern-uri a fost categoria cea mai frecventă (38,9%), al doilea ca frecvență a fost modelul de creștere sub formă de cuiburi, insule sau plaje (21,9%), iar cel mai puțin întâlnit pattern a fost cel mucinos (0,9%). Din tabelul de contingență între aceste două variabile, a reieșit că cele mai multe cazuri au fost reprezentate de cele cu concordanță totală, având o asociere de mai multe pattern-uri (17,9%). Se mai remarcă faptul că au existat categorii fără cazuri înregistrate (0): pattern mucinos cu discordanță totală sau cu discordanță cu privire la grading, precum și discordanță cu privire la originea tumorii primare în pattern-urile papilar/micropapilar și fascicular/storiform. Testul Chi-pătrat a identificat o corelație cu semnificație statistică ($p=0.000$) între variabilele pattern histologic și concordanță.

Referitor la grading, majoritatea tumorilor au fost încadrate în categoria G2 (moderat diferențiate), ele reprezentând 38,8% din total, iar următoarele ca frecvență au fost tumorile slab diferențiate (G3), în 24,8% din cazuri. Tumorile bine diferențiate (G1) au fost prezente în 12,4% din cazuri, iar în alte 11,5% din cazuri, nu au putut fi încadrate în nicio categorie de grading, din lipsa consensurilor din literatura de specialitate, iar tumorile nediferențiate (G4) au reprezentat doar 1,7% din lotul de studiu. Cele mai multe cazuri au fost încadrate în categoriile concordanță totală, cu grad G2 (19,8%), iar referitor la cele mai puține, au existat 3 categorii cu zero cazuri: discordanță cu privire la subtipul tumoral cu grad LG, discordanță cu privire la grading cu grad G4 și discordanță cu privire la originea tumorii primare cu grad LG. În cadrul concordanței totale, categoria de grading cea mai bine reprezentată a fost G2 (42%), la fel și în cazul discordanței referitoare la grading (57,4%), a celei referitoare la subtipul tumoral (31,6%), în timp ce în cadrul discordanței totale a fost G3 (37,5%) și în cadrul celei referitoare la originea tumorii primare, G2 și G3 au avut incidențe identice (37,1%). Se mai pot evidenția următoarele: în cadrul cazurilor cu grad G4, a existat un procent înalt de concordanțe totale, identic cu cel din cadrul LG (66,7%), iar în cadrul G1 și G2, peste jumătate din cazuri au fost cu concordanță totală (52,9%, respectiv 51,1%), ambele categorii având procente apropiate și în ceea ce privește discordanța referitoare la grading (20%, respectiv 21,8%). Testul Chi-pătrat a identificat o corelație cu semnificație statistică ($p=0.000$) între variabilele grading și concordanță.

În ceea ce privește caracterul primar sau secundar al tumorilor, lotul a fost constituit preponderent din tumori primare (79,7%), în timp ce tumorile metastatice au reprezentat 20,3%. În cadrul tumorilor primare, concordanța totală a fost stabilită în 51,5% din cazuri, în timp ce în cadrul metastazelor – în 30,4% dintre acestea, cu mai multe situații de discordanță totală (33,3%) în această categorie, în cadrul căreia se constată un procent destul de ridicat și de discordanțe cu privire la originea tumorii primare (23,2%). În cadrul categoriilor de concordanță, se observă procente extrem de ridicate în cazul tumorilor primare față de metastaze în cazul discordanței cu privire la grading (94,1% vs. 5,9%), al discordanței cu privire la subtipul tumoral (89,5% vs. 10,5%) și al concordanței totale (87% vs. 13%), iar situația este inversă în cazul discordanței cu privire la originea tumorii primare (8,6% vs. 91,4%). Testul Chi-pătrat a identificat o corelație cu semnificație statistică ($p=0.000$) între variabilele caracter primar sau secundar și concordanță.

În cadrul bazei de date, cea mai frecventă clasă tumorală a fost reprezentată de carcinoame (89,3%), urmată de sarcoame (3,8%), melanoame (3,2%) și tumori gliale (1,7%), celelalte categorii (limfoame, tumori cu celule germinale, mezotelioame) fiind extrem de rare, întâlnite în sub 1% din cazurile studiate. În cazul celei mai frecvente clase, cea a carcinoamelor, concordanța totală a fost întâlnită în 45,8% din cazuri, în timp ce discordanțele cu privire la subtip, respectiv la grading – au avut incidențe apropiate (16,8%, respectiv 16,2%). În cazul carcinoamelor, discordanța totală a fost prezentă în 15,5% dintre acestea, iar discordanța cu privire la originea tumorii primare – în 5,7%. Referitor la sarcoame, concordanța totală a fost înregistrată în 53,8% din cazuri, iar discordanța totală – în 23,1% din cazuri. Concordanța totală în cazul melanoamelor a fost întâlnită într-un procent mai mare decât în cazul claselor tumorale de mai sus (68,2%), iar discordanța totală pentru această categorie a fost prezentă în 22,7% din cazuri. În cazul limfoamelor, se poate observa că au predominat discordanțele – cea totală și cea cu privire la subtipul tumoral au însumat fiecare câte 40%, în timp ce concordanța totală a fost notată în 20% din cazuri. Tumorile gliale și tumorile cu celule germinale au avut același procent înalt de concordanță totală (75%), în timp ce în cazul mezotelioamelor maligne, discordanța totală a fost întâlnită în 75% din cazuri, iar concordanța totală în restul de 25%.

7.4. Discuții

Analiza concordanței între diagnosticul histopatologic în colorație H&E și diagnosticul stabilit după teste IHC a evidențiat o serie de aspecte importante, rezultatele obținute arătând că există atât concordanțe totale, cât și discordanțe semnificative între diagnosticile stabilite utilizând cele două metode de diagnostic.

Concordanța totală a fost înregistrată în 47,2% dintre cazuri, indicând o suprapunere completă între diagnosticile histopatologice H&E și cele IHC. Această rată de concordanță subliniază fiabilitatea tehnicii H&E în numeroase situații, dar în același timp, sugerează necesitatea testelor IHC pentru a confirma diagnosticul, în special în cazurile complexe.

Discordanțele totale, reprezentând 16,3% dintre cazuri, au fost determinate în principal de diferențele de subtip tumoral, grading și originea tumorii primare. Aceste discordanțe pot fi atribuite limitărilor morfologice ale colorației H&E care nu pot evidenția caracteristicile moleculare specifice ale tumorilor. Testele IHC, prin utilizarea markerilor specifici, pot clarifica aceste aspecte, conducând la ajustări ale diagnosticului inițial.

Discordanțele cu privire la subtipul tumoral au fost prezente în 16,6% dintre cazuri. Aceste diferențe evidențiază dificultatea identificării corecte a subtipului tumoral doar pe baza morfologiei, subliniind importanța testelor IHC în stabilirea unui diagnostic precis. Exemple relevante includ diferențierea între carcinomul seros și cel endometrioid, sau între carcinomul mamar invaziv de tip ductal și cel de tip lobular, unde markerii IHC joacă un rol decisiv pentru tranșarea diagnosticelor.

Discordanțele cu privire la grading au fost identificate în 14,7% dintre cazuri. Acestea pot avea implicații semnificative asupra planului de tratament și prognosticului pacientului.

Discordanțele cu privire la originea tumorii primare au fost observate în 5,1% dintre cazuri, în special în cazul metastazelor. Aceste erori pot rezulta din interpretări greșite ale caracteristicilor morfologice în colorația H&E. Testele IHC sunt esențiale pentru determinarea corectă a originii tumorale, folosind markeri specifici pentru țesuturile de origine.

Mai mulți factori au fost analizați pentru a determina influența lor asupra concordanței diagnostice. S-a constatat că tipul de eșantion tisular influențează semnificativ concordanța diagnostică. Biopsiile incizionale/excizionale au avut cel mai mic procent de concordanță totală (44,3%) comparativ cu microbiopsiile (52,1%) și piesele de rezecție chirurgicală (50,8%). Nu s-a găsit o asociere semnificativă statistic între prezența artefactelor și categoriile de concordanță,

indicând că artefactele nu influențează semnificativ rezultatele diagnostice. Pe de altă parte, s-a observat o relație între prezența necrozei și discordanța totală (21,5% în cazurile cu necroză față de 14,5% în cazurile fără necroză), sugerând că necroza poate complica evaluarea morfologică a tumorilor.

S-a constatat o asociere puternică între pattern-ul histologic și concordanța diagnostică, cu valori variind semnificativ între diferite tipuri de pattern-uri. Pattern-urile asociate mai multor tipuri de creștere au avut cea mai mare rată de concordanță totală (38%). S-a găsit o relație moderată între grading și concordanța diagnostică. Tumorile cu grad G2 (moderat diferențiate) au prezentat cea mai mare rată de concordanță totală (51,1%).

S-a evidențiat o diferență semnificativă între concordanța diagnostică a tumorilor primare și a metastazelor. Tumorile primare au avut o rată de concordanță totală de 51,5%, comparativ cu doar 30,4% în cazul metastazelor. Carcinoamele au avut o rată de concordanță totală de 45,8%, iar discordanțele cu privire la subtipul tumoral și grading au fost mai frecvente comparativ cu alte clase tumorale.

Definiția concordanței utilizată în acest studiu a fost ușor diferită față de cea folosită de Sa și Kumar [109], care au diferențiat între concordanța parțială și cea completă. Aslan și colab. [110] au definit concordanța clinico-patologică ca fiind un diagnostic histopatologic clar sau descriptiv care este concordant cu diagnosticul inițial. În plus, Korfitis și colab. [111] au recunoscut patru grupuri de concordanță histopatologică bazate pe similaritatea diagnosticelor histologice cu diagnosticul inițial specific, categoria de boală și faptul că acestea sunt un subset sau se suprapun parțial cu diagnosticele inițiale propuse. Având în vedere că toate definițiile de mai sus au folosit rapoartele histopatologice ca standard de aur, variabilitatea în definirea concordanței a avut un impact minim asupra rezultatelor acestor studii, care au raportat concordanțe comparabile [112], [113].

Superioritatea concordanței totale în cazul rezecțiilor poate fi atribuită faptului că aceasta furnizează anatomopatologului o cantitate suficientă de țesut pentru examinare. Într-adevăr, speciemele insuficiente au fost raportate drept una dintre cele mai mari provocări pentru anatomopatologi în stabilirea unui diagnostic precis. Studiile anterioare fie nu au investigat impactul factorilor legați de biopsie asupra concordanței, fie au prezentat rezultate contradictorii. De exemplu, Aslan și colab. [110] nu au identificat nicio asociere între tipul biopsiei și

concordanță, în timp ce Korfitis și colab. [111] au evidențiat o asociere semnificativă între tipul probei și concordanță.

O altă cauză a discordanței, investigată în literatura de specialitate este reprezentată de heterogenitatea intratumorală. Morris și colab. [114] au evidențiat că, în cazul tumorilor mari, heterogenitatea histologică între periferia și centrul tumorii a fost prezentă în 29% dintre cazuri.

Arbiser și colab. [115], pe baza a 500 de cazuri de consult, au raportat discrepanțe patologice majore în 25% din cazuri și discrepanțe minore în 7% din cazuri. Thway și Fisher [116] au raportat discrepanțe majore în 10,9% și discrepanțe minore în 15,7% din cazurile de sarcoame ale țesuturilor moi trimise la Royal Marsden Hospital. Într-un studiu bazat pe populație, Lurkin și colab. [117] au constatat că doar 54% dintre cazurile examinate aveau o concordanță completă între diagnosticul primar și opinia secundară de expert. Într-un studiu similar bazat pe populație, Ray-Coquard și colab. [118] au raportat că 56% dintre toate cazurile aveau o concordanță completă între diagnosticul primar și opinia secundară. În unele dintre studiile din literatura de specialitate, interpretările diferite ale subtipurilor de tumori au fost clasificate ca discordante minore („acord parțial”) [119], [120].

7.5. Concluzii

Studiul de față evidențiază necesitatea integrării testelor IHC în practica curentă pentru a îmbunătăți acuratețea diagnosticului anatomopatologic și a personaliza tratamentele oncologice. Concordanțele și discordanțele identificate oferă o perspectivă valoroasă asupra limitărilor și beneficiilor fiecărei metode diagnostice.

Testele IHC sunt esențiale pentru confirmarea și completarea diagnosticului histopatologic realizat prin colorația H&E. Deși colorația H&E oferă informații valoroase despre morfologia tisulară, testele IHC aduc clarificări suplimentare prin evidențierea caracteristicilor moleculare specifice, reducând astfel posibilitatea erorilor diagnostice.

Analiza statistică a relevat importanța variabilelor precum tipul de eșantion tisular, pattern-ul histologic și clasa tumorală în influențarea concordanței diagnostice.

Studiul a arătat că există o rată semnificativă de concordanță totală (47,2%) între diagnosticile H&E și IHC, subliniind fiabilitatea metodei H&E în numeroase cazuri. Cu toate acestea, discordanțele totale (16,3%) indică necesitatea testelor IHC pentru cazurile mai complexe, unde diagnosticul inițial poate fi insuficient.

Biopsiile incizionale/excizionale prezintă o rată mai mică de concordanță comparativ cu microbiopsiile și piesele de rezecție chirurgicală, sugerând necesitatea unor tehnici de prelevare mai precise și reprezentative.

Artefactele nu au avut un impact semnificativ asupra concordanței diagnostice, ceea ce indică faptul că tehnicile utilizate au fost suficient de robuste și precise pentru a asigura un diagnostic corect și reproductibil, chiar și în prezența unor posibile interferențe tehnice minore.

Prezența necrozei tumorale a fost asociată cu o rată mai mare de discordanțe totale, subliniind necesitatea unei evaluări atente în astfel de cazuri.

Există o asociere puternică între pattern-ul histologic și discordanțele diagnostice, ceea ce sugerează că tipul de creștere tumorală este un factor critic în evaluarea morfopatologică.

Tumorile cu grading G2 au prezentat cea mai mare rată de concordanță, iar discordanțele au fost mai frecvente în cazurile cu grading G3 și G4, indicând complexitatea acestor cazuri.

Tumorile primare au avut o rată mai mare de concordanță totală comparativ cu metastazele, sugerând că metastazele necesită o evaluare suplimentară prin teste IHC pentru a stabili corect originea și subtipul tumorii.

Adenocarcinoamele au fost cele mai frecvente și au prezentat rate variabile de concordanță și discordanță, subliniind diversitatea și complexitatea acestei categorii tumorale.

Rezultatele sugerează necesitatea dezvoltării unor ghiduri și protocoale care să includă factori precum tipul de eșantion, grading-ul tumoral și pattern-ul histologic pentru a optimiza procesul diagnostic.

Capitolul 8. Studiul predicției diagnosticului histopatologic pe baza markerilor IHC cu ajutorul unui sistem de învățare automată

8.1. Introducere

Interpretarea datelor IHC poate varia în funcție de experiența fiecărui anatomopatolog, iar volumul mare de informații din literatura de specialitate, aflat în expansiune continuă, privind expresia markerilor IHC în anumite tumori, poate duce adesea la interpretări divergente, mai ales în cazurile complexe [121]. Cercetătorii au acum acces la o multitudine de noi anticorpi și un

volum important de date privind expresia IHC pentru o gamă largă de tipuri de tumori, astfel încât nu este practic pentru anatomopatologi să memoreze fiecare tip de expresie a fiecărui anticorp cunoscut, în orice tumoră care poate apărea în diverse țesuturi [122]. Această problemă poate fi rezolvată prin utilizarea panelurilor standardizate de markeri și a unor algoritmi pentru diagnostice specifice, dar în practică, fiecare caz are caracteristici unice, iar în anumite situații, utilizarea panelurilor IHC poate fi atât consumatoare de timp, cât și extrem de costisitoare [123].

Așadar, descoperirea unei metode mai eficiente de diferențiere între subtipurile tumorale este extrem de dorită, în special în ceea ce privește potențialele aplicații clinice. În acest sens, ar fi avantajos să se dezvolte un instrument de diagnostic histopatologic practic, care să folosească pe cât posibil cât mai puțini markeri IHC, care să poată fi utilizat ca metodă eficientă pentru clasificarea diferitelor tipuri de tumori.

În ultimele decenii, inteligența artificială (IA), mai ales prin tehnologiile de învățare automată (Machine Learning – ML) a facilitat gestionarea datelor complexe ale cancerului prin crearea unor instrumente de diagnostic automate, fiabile și ușor de utilizat pentru aplicații clinice și paraclinice [124], [125]. Utilizarea acestor tehnologii promite îmbunătățirea acurateții diagnosticului și eficienței clinice, reducând totodată timpul necesar pentru interpretarea datelor complexe.

8.2. Material și metodă

Analizând datele din literatura de specialitate, am ales pentru antrenare eXtreme Gradient Boosting (XGBoost), o metodă de învățare automată (ML) din ce în ce mai populară, care utilizează conceptul de „tree boosting” pentru a scala eficient, a cărei performanță a atras atenția cercetătorilor datorită scalabilității și performanței sale superioare, depășind numeroși clasificatori tradiționali în domeniul învățării automate [126].

Bazele de date utilizate pentru studiile redate anterior au fost adaptate pentru obiectivele acestui studiu, fiind reconfigurate prin îndepărtarea informațiilor care nu au fost necesare pentru antrenarea modelului XGBoost, conținând o coloană cu diagnosticul histopatologic (incluzând toate subtipurile) și 58 de coloane cu markerii IHC utilizați, cu rezultatele pentru toți cei 686 de pacienți din lotul de studiu. Pentru a demonstra precizia algoritmului de predicție a diagnosticului, a fost utilizat un nou set de 21 de pacienți pentru validare, după ce modelul a fost antrenat și testat.

Pentru a genera un model de predicție, s-a utilizat software-ul Exploratory Desktop, versiunea 6.12.5.2, dezvoltat de Exploratory, Inc., în cadrul căruia a fost aplicat modelul de învățare XGBoost, unde variabila de intrare (variabila țintă) a fost diagnosticul histopatologic, iar predictorii (variabilele independente care influențează variabila țintă) au fost markerii imunohistochimici.

După ce programul analizează informațiile introduse din baza de date, vor fi calculate scorurile de precizie (precision) medie micro și macro, scorurile de rechemare (recall) mediu micro și macro, rata de acuratețe (accuracy), scorul F1 și rata de clasificare greșită (missclassification rate). Dintre acestea, poate cel mai important metric este scorul F1, folosit pentru evaluarea performanței XGBoost, echilibrând precizia și rechemarea. Scorul F1 reprezintă media armonică a preciziei și rechemării, oferind o măsură singulară care cuprinde ambele aspecte ale acurateții modelului [127].

8.3. Rezultate

După colectarea datelor, un total de 686 de cazuri au fost incluse în setul de date de antrenament și validare, iar 21 de cazuri au fost utilizate pentru setul de date de testare. Anticorpii IHC, cu o medie de 5,4 per caz (interval 2-11), au fost utilizați în procesul de diagnosticare.

Au fost identificate în total 44 de diagnostice histopatologice în 24 de organe sau țesuturi. Totuși, datorită dimensiunii limitate a eșantionului pentru unele diagnostice, doar 20 au fost incluse în calculele efectuate de către modelul XGBoost. Adenocarcinomul, cu diverse localizări precum sânul, prostata, plămânul și colonul, a fost identificat ca fiind cel mai frecvent diagnostic. Cazurile de mezoteliom malign, tumoră mixtă de celule germinale și limfom non-Hodgkin au fost încadrate într-o categorie nou creată numită „Altele” (eng. „Others”) de către program din cauza numărului lor limitat.

În ceea ce privește markerii IHC prezenți în baza de date, modelul XGBoost a generat un raport despre importanța acestora în legătură cu ajutorul acordat software-ului pentru a stabili un diagnostic histopatologic, iar cel mai important a fost considerat E-cadherin, ceea ce este explicabil prin faptul că acesta este utilizat la tranșarea diagnosticelor diferențiale în cadrul carcinoamelor mamare invazive, care au reprezentat categoria de diagnostice histopatologice cu cel mai mare număr de cazuri. Următorul marker ca importanță a fost considerat p63, fiind de

altfel frecvent testat în carcinoamele scuamocelulare, care au fost prezente la 111 pacienți, precum și în adenocarcinoamele de prostată și carcinoamele uroteliale.

După ce a fost antrenat modelul XGBoost în cadrul software-ului Exploratory Desktop, folosind informațiile introduse din baza de date, au fost obținute performanțele următoare:

- valoarea de 0,8597 obținută pentru Scorul F Micro-Mediu, care sugerează că modelul se comportă bine în distingerea între clase;
- Scorul F Macro-Mediu de 0,8446 indică faptul că, în medie, modelul se comportă bine în toate clasele create. Acest lucru înseamnă că atât precizia (noile cazuri), cât și rechemarea (cazurile utilizate pentru învățare) sunt echilibrate când se analizează fiecare clasă în mod individual);
- Scorul F Micro-Mediu de 0,8597 este ușor mai mare decât scorul F Macro-Mediu de 0,8446, sugerând că modelul se comportă ușor mai bine atunci când sunt luate în considerare contribuțiile individuale ale fiecărei instanțe, în loc să se analizeze fiecare clasă.
- Rata de acuratețe de 0,8597 înseamnă că modelul prezice corect 85,97% din cazurile din setul de date. Acest lucru indică un nivel ridicat de performanță și sugerează că modelul este fiabil în a face predicții corecte în cea mai mare parte a timpului.

Analizând valoarea scorului F1 pentru fiecare diagnostic histopatologic, cea mai mare rată a F1 a fost pentru adenocarcinomul acinar prostatic, carcinomul hepatocelular și melanom, cu un scor de 1, ceea ce înseamnă că modelul a identificat corect 100% din toate cazurile reale cu aceste diagnostice. Cea mai scăzută rată de precizie în predicțiile corecte a fost observată la adenocarcinomul de colon tipul mucinos, urmat de sarcomul nediferențiat pleomorf și carcinomul endometrioid.

După antrenarea și testarea modelului, a fost utilizat pentru validare noul set de 21 de pacienți. Rezultatele obținute după aplicarea modelului XGBoost pe acest nou lot au arătat că toate diagnosticele cu un scor F1 ridicat în setul de date de antrenament au fost similare cu cele din setul de date de validare și toate au fost prezise corect. Sistemul de învățare automată nu a reușit să prezică diagnosticele cu un scor F1 scăzut, precum și pe cele clasificate în categoria „Altele”, chiar dacă unele au fost într-adevăr prezise ca fiind diagnostice din categoria „Altele”.

8.4. Discuții

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu au evidențiat potențialul semnificativ al utilizării unui sistem de învățare automată, pentru predicția diagnosticului histopatologic bazat pe markerii IHC. Analiza acestor rezultate oferă perspective asupra eficienței și limitărilor acestui model în diagnosticarea tumorilor, care să ofere suport decizional anatomopatologilor, facilitând obținerea unui diagnostic mai precis și rapid.

În studiul prezentat, am validat probabilitatea estimată de diagnostic pentru anumite diagnostice histopatologice bazate pe markeri imunohistochimici specifici, folosind model de învățare automată de tip arbore de decizie probabilistic, XGBoost. Același model a fost aplicat și în alte studii pentru identificarea subtipurilor de cancer pulmonar și cancer de colon [128], prezicerea metastazelor pulmonare din cancerul tiroidian [129] și dezvoltarea modelelor de risc pentru detectarea cancerului pulmonar [130], toate acestea demonstrând o performanță ridicată.

Studiul nostru a demonstrat o rată de precizie de 85,97% în cadrul setului de date, indicând un nivel ridicat de performanță și sugerând că modelul este în general fiabil în producerea de predicții precise. Rata de precizie a diagnosticelor prezise a fost în general mai mare în comparație cu cercetările anterioare privind tumori de origine necunoscută, care au raportat o rată de precizie de 79,9% [29]. Totuși, aceasta a fost mai mică decât într-un studiu privind limfoamele, care a atins o rată de precizie de 95% [131].

În studiul de față, rata mai mare de precizie s-a observat în diagnostice precum adenocarcinoame cu diverse localizări și melanom. Am atribuit această constatare faptului că sistemul de învățare automată oferă predicții mai precise atunci când este antrenat pe un număr mai mare de cazuri. Și alte studii au arătat că acuratețea pentru fiecare tip de tumoră este strâns legată de dimensiunea corespunzătoare a eșantionului, precum și faptul că un dezechilibru în setul de date complică realizarea unei performanțe ridicate [132]–[134].

Modelul a arătat o concordanță ridicată cu diagnosticele stabilite prin metodele tradiționale, în special pentru anumite diagnostice comune, cum ar fi adenocarcinomul acinar de prostată, carcinomul hepatocelular și melanomul malign, toate având un scor F1 de 1. Cu toate acestea, pentru diagnosticele mai rare sau complexe, precum adenocarcinomul de colon mucinos și sarcomul nediferențiat pleomorf, modelul a avut o performanță mai scăzută, ceea ce sugerează necesitatea îmbunătățirii algoritmului pentru a gestiona mai bine aceste cazuri.

În ciuda performanțelor promițătoare, modelul XGBoost a prezentat câteva limitări. Acesta a avut dificultăți în predicția corectă a diagnosticelor rare și a celor incluse în categoria „Altele”. Acest lucru poate fi atribuit dimensiunii reduse a setului de date pentru aceste categorii, ceea ce limitează capacitatea modelului de a învăța caracteristicile specifice ale acestor diagnostice. De asemenea, modelul a avut tendința de a confunda anumite diagnostice cu un profil IHC similar, evidențind necesitatea unei ajustări mai fine a parametrilor modelului.

Analiza importanței markerilor IHC a relevat că markerii E-cadherin, p63 și CDX2 au avut cea mai mare influență asupra predicțiilor modelului. Acest lucru reflectă că acești markeri sunt extrem de utili în diagnosticarea anumitor subtipuri tumorale, în special cele care au fost și reprezentate de o cazuistică numeroasă. De exemplu, E-cadherina este indispensabilă în diagnosticul diferențial între carcinomului mamar invaziv de tip lobular și cel de tip ductal.

După cum s-a menționat anterior, studiul prezent a folosit un sistem binar de exprimare a markerilor IHC (pozitiv sau negativ) pentru a prognoza diagnosticul histopatologic. În literatura de specialitate, mai multe studii bazate pe același sistem de învățare automată s-au concentrat pe dezvoltarea modelelor matematice capabile să prezică tipurile de cancer folosind caracteristici moleculare, cum ar fi expresia genică, profilele de metilare a ADN-ului sau analiza alterărilor somatice [135]–[138]. Prin includerea mutațiilor genetice ale genelor driver și a caracteristicilor complexe legate de variațiile structurale, Nguyen și colab. [138] au realizat predicția a aproximativ 35 de subtipuri diferite de cancer cu o precizie de aproximativ 90%. Marquard și colab. [139] au distins cu succes între 10 tipuri de cancer cu o precizie de 69% și între 6 tipuri de cancer cu o precizie de 85%, luând în considerare doar mutațiile somatice sau atât mutațiile somatice cât și modificările numărului de copii. Utilizând prezența mutațiilor somatice punctiforme și a modificărilor numărului de copii în 50 de gene ca caracteristici predictive, Soh și colab. [133] au obținut o precizie de aproximativ 77% în cazul a 28 de tipuri distincte de cancer.

O altă metodă pentru prezicerea diagnosticelor histopatologice, documentată în literatura științifică, implică utilizarea sistemelor de învățare automată care analizează proprietățile celulare precum dimensiunea nucleară și omogenitatea populațiilor celulare. Acest abordare are utilitate clinică pentru distingerea diferitelor grupuri celulare. Moran et al. [140] au utilizat modulul de detectare a celulelor din cadrul QuPath, o platformă de analiză a imaginilor open-source pentru patologie digitală, pentru a extrage caracteristici morfologice ale carcinomului cu

celule Merkel. Conform rezultatelor lor, aria nucleară și circularitatea au fost factori prognostici semnificativi pentru MCC. Faridi et al. [141] au folosit metode de creștere a regiunii pentru segmentarea celulelor, extrăgând caracteristici morfologice precum dimensiunea nucleară, soliditatea și excentricitatea pentru a evalua scorurile de pleomorfism ale imaginilor întregului preparat de cancer de sân, și au obținut acuratețe de 86,6%.

8.5. Concluzii

Acest studiu a demonstrat posibilitatea utilizării unui algoritm de tip arbore de decizie probabilistic pentru diferențierea diagnosticelor tumorale în funcție de profilurile imunohistochimice, arătând totodată și eficiența acestui model, care a înregistrat performanțe ridicate: o bună acuratețe și o rată de clasificare greșită mică. Modelul XGBoost antrenat a prezentat o concordanță semnificativă cu diagnosticile înregistrate în baza de date, ceea ce sugerează că poate fi un instrument complementar valoros în practica anatomopatologică.

Principalele surse de eroare în cadrul acestui sistem includ multitudinea markerilor cu specificități diferite pentru diversele subtipuri tumorale, prezența profilurilor IHC suprapuse între diferite tumori, lipsa de markeri specifici pentru anumite diagnostice, existența tumorilor mixte și a profilurilor atipice de expresie a markerilor IHC. O altă sursă de eroare provine din numărul limitat de cazuri disponibile în setul de date de antrenament pentru fiecare diagnostic în parte. Cercetările viitoare ar trebui să abordeze această problemă prin mărirea dimensiunii eșantionului pentru fiecare categorie diagnostică, permițând o analiză mai robustă și o validare mai puternică a rezultatelor. Cu toate acestea, acest model de învățare automată poate servi ca un ajutor valoros pentru medicii anatomopatologi în formularea unor diagnostice precise, cu reducerea timpului necesar pentru diagnosticare și o mai bună rată de concordanță între medicii evaluatori.

Totodată, acest studiu subliniază importanța continuării cercetării în acest domeniu și dezvoltării de modele mai avansate, antrenate pe loturi mai mari și mai diverse, pentru a maximiza beneficiile acestor tehnologii în diagnosticul histopatologic al tumorilor. De asemenea, ar fi utilă investigarea altor algoritmi de învățare automată și combinarea acestora într-un ansamblu pentru a îmbunătăți acuratețea predicțiilor. Cu ajustări și îmbunătățiri suplimentare, aceste tehnologii ar putea deveni un instrument standard în serviciile de anatomie patologică.

Capitolul 9. Concluzii finale, originalitatea tezei doctorale și perspective de cercetare

În cadrul acestei teze de doctorat, am analizat detaliat importanța și limitele utilizării markerilor imunohistochimici în diagnosticul histopatologic al tumorilor maligne, comparând totodată concordanța diagnosticelor în colorație H&E cu cele stabilite după interpretarea testelor IHC. De asemenea, a fost studiat potențialul tehnologiilor de inteligență artificială în acest context, prin antrenarea unui model de învățare automată pe baza markerilor IHC, cu scopul de a îmbunătăți precizia diagnosticelor.

Studiul histopatologic și imunohistochimic al tumorilor maligne (Capitolul 6) a demonstrat valoarea combinării histopatologiei clasice cu analiza IHC pentru a îmbunătăți specificitatea și sensibilitatea diagnosticului tumorilor maligne. Utilizarea markerilor IHC specifici a permis o identificare mai precisă a tipurilor și subtipurilor tumorale. Analiza epidemiologică a evidențiat diferențele în distribuția pe sexe, medii de proveniență, precum și incidența mai mare a adenocarcinoamelor cu diverse localizări în populația studiată.

Totodată, a fost subliniată diversitatea markerilor imunohistochimici utilizați pentru diagnosticarea diferitelor subtipuri de tumori maligne. Am demonstrat că integrarea datelor IHC în diagnosticul histopatologic standard poate crește semnificativ acuratețea și specificitatea diagnosticelor, reducând frecvența erorilor, mai ales în cazul metastazelor tumorale.

Studiul concordanței între diagnosticul histopatologic în colorație H&E și cel stabilit după testele IHC (Capitolul 7) a evidențiat variabilitatea în interpretarea diagnosticelor histopatologice, subliniind necesitatea utilizării testelor IHC pentru confirmarea diagnosticului tumorilor maligne. Rezultatele au arătat că, deși există o concordanță ridicată între diagnosticile histopatologice H&E și cele IHC (47,2% din cazuri), există și diferite tipuri de discordanțe diagnostice, mai ales în cazurile complexe, subliniind importanța IHC pentru diagnosticul precis al tumorilor. Tipul de eșantion tisular, prezența necrozei tumorale și pattern-ul histologic au fost identificați ca factori cheie în influențarea concordanței diagnostice. Tumorile primare au avut o rată mai mare de concordanță comparativ cu metastazele, sugerând necesitatea unei evaluări suplimentare prin teste IHC pentru metastaze. Tumorile cu grading G2 au prezentat cea mai mare rată de concordanță, în timp ce cazurile cu grading G3 și G4 au avut o frecvență mai mare a discordanțelor. Discordanțele totale indică necesitatea testelor IHC pentru cazurile mai complexe.

Studiul predicției diagnosticului histopatologic pe baza markerilor IHC cu ajutorul unui sistem de învățare automată (Capitolul 8) a explorat potențialul algoritmilor de învățare automată, de tip arbore de decizie, cum ar fi XGBoost, pentru clasificarea tumorilor pe baza profilurilor IHC, cu scopul predicției diagnosticului histopatologic pe baza markerilor IHC. Algoritmul a prezentat o acuratețe ridicată în predicția diagnosticului histopatologic, oferind un instrument complementar valoros pentru anatomopatologi. Principalele surse de eroare au inclus variabilitatea expresiei markerilor IHC, multitudinea markerilor cu specificități diferite pentru diversele subtipuri tumorale, prezența profilurilor IHC suprapuse între diferite tumori și numărul limitat al anumitor subtipuri tumorale pentru antrenarea modelului, sugerând necesitatea extinderii seturilor de date și a dezvoltării unor modele mai avansate pentru a maximiza beneficiile acestor tehnologii. Modelul de învățare automată a înregistrat performanțe ridicate, demonstrând o acuratețe ridicată și o rată mică de clasificare greșită, arătând potențialul acestor tehnologii de a servi ca instrumente complementare valoroase în practica anatomopatologică.

Originalitatea acestei cercetări doctorale poate fi evidențiată prin mai multe aspecte inovatoare și contribuții în domeniul diagnosticului anatomopatologic al tumorilor maligne. Studiul aduce o abordare integrativă prin combinarea metodelor tradiționale de histopatologie cu tehnicile imunohistochimice și algoritmii de învățare automată. Aceasta reprezintă un progres semnificativ față de metodele convenționale utilizate în diagnosticarea tumorilor maligne, demonstrând cum tehnologiile moderne pot îmbunătăți acuratețea și specificitatea diagnosticelor.

De asemenea, a fost realizată o evaluare detaliată a concordanței între diagnosticile în colorație uzuală și cele stabilite după testele IHC, cu identificarea și analiza factorilor care contribuie la discordanțe, fiind un aspect original, extrem de important pentru înțelegerea limitelor și beneficiilor utilizării markerilor IHC în practica diagnostică. În literatura de specialitate, nu au fost identificate numeroase studii referitoare la concordanța diagnosticelor histopatologice, mai ales în cazul unei game atât de largi de tumori. Această analiză a concordanței diagnosticelor histopatologice reprezintă o noutate în țara noastră, fiind prima de acest fel.

Totodată, folosind o bază de date amplă, au fost obținute rezultate bune privind predicția diagnosticului pe baza markerilor IHC prin utilizarea algoritmilor de învățare automată. Aceasta este o abordare modernă, care evidențiază potențialul tehnologiilor de inteligență artificială în anatomia patologică, deschizând noi perspective pentru utilizarea acestor instrumente de către

medici anatomopatologi cu puțină experiență în interpretarea marcajelor IHC sau cu un volum de lucru foarte mare.

Prin aceste contribuții, teza de doctorat nu doar că aduce noi perspective și metode în diagnosticul tumorilor maligne, dar și deschide noi direcții de cercetare și aplicare practică a tehnologiilor avansate în anatomia patologică. Originalitatea cercetării doctorale stă în integrarea abordării multimetodice și în dezvoltarea unor soluții complementare pentru o acuratețe mai bună a diagnosticelor anatomopatologice.

În ceea ce privește perspectivele de cercetare, în primul rând putem sublinia că identificarea și validarea unor noi markeri IHC pot aduce beneficii semnificative în diagnosticul tumorilor maligne, în special prin descoperirea unor anticorpi cu specificitate și sensibilitate mai mare pentru anumite subtipuri tumorale, pe baza cărora să se îmbunătățească acuratețea diagnostică.

Este indicată dezvoltarea de ghiduri și protocoale standardizate de diagnostic histopatologic și imunohistochimic, care să includă obligatoriu măcar tipul de eșantion tisular, pattern-ul histologic, prezența sau absența necrozei și grading-ul tumoral pentru a optimiza procesul diagnostic și a reduce erorile diagnostice.

Ar putea fi evaluată cost-eficiența utilizării panelurilor standardizate de markeri IHC în comparație cu panelurile personalizate pentru fiecare caz.

Totodată, este optimă extinderea cercetărilor în utilizarea inteligenței artificiale, spre exemplu investigarea altor algoritmi de învățare automată și combinarea acestora într-un ansamblu ar putea îmbunătăți acuratețea predicțiilor diagnostice. Cercetările viitoare ar putea să extindă seturile de date utilizate pentru antrenarea modelelor de învățare automată prin includerea unui număr mai mare de cazuri și diversificarea subtipurilor de tumori. De asemenea, dezvoltarea unor modele hibride care să integreze datele clinice, imagistice, histopatologice și imunohistochimice pentru o diagnosticare mai precisă și personalizată a pacienților oncologici.

În concluzie, studiul de față subliniază importanța, dar și limitele testelor IHC în diagnosticul histopatologic, relevă factorii care influențează concordanța diagnostică și demonstrează potențialul tehnologiilor de învățare automată în acest domeniu. Perspectivele de cercetare propuse vizează îmbunătățirea continuă a metodelor diagnostice, având ca obiectiv final optimizarea managementului pacienților oncologici.

BIBLIOGRAFIE

- [1] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018,” *Eur. J. Cancer*, vol. 103, pp. 356–387, 2018, doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005.
- [2] Institutul Național de Sănătate Publică, “Buletin informativ nr. 9/2019, Cauze de deces în România,” 2019. [Online]. Available: http://cnsisp.insp.gov.ro/wp-content/uploads/2020/06/Buletin-Informativ-CAUZE-DECES-2018_2019.pdf
- [3] Institutul Național de Sănătate Publică, “Buletin informativ nr. 3/2020, Principalii indicatori ai cunoașterii stării de sănătate pe trimestrul I 2020 comparativ cu trimestrul I 2019,” 2020, [Online]. Available: <https://insp.gov.ro/download/buletin-informativ-principalii-indicatori-ai-cunoasterii-starii-de-sanatate-anul-2020-comparativ-cu-anul-2019/>
- [4] V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, R. S. Cotran, and S. L. (Stanley L. Robbins, *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*.
- [5] A. Patel, “Benign vs Malignant Tumors,” *JAMA Oncol.*, vol. 6, no. 9, p. 1488, 2020, doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2592.
- [6] C. Fletcher, *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.
- [7] J. J. Berman, “Tumor classification: Molecular analysis meets Aristotle,” *BMC Cancer*, vol. 4, pp. 1–9, 2004, doi: 10.1186/1471-2407-4-10.
- [8] J. J. Berman, “Tumor taxonomy for the developmental lineage classification of neoplasms,” *BMC Cancer*, vol. 4, pp. 1–6, 2004, doi: 10.1186/1471-2407-4-88.
- [9] “IARC Publications Website - WHO Classification of Tumours.” <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours> (accessed Nov. 18, 2023).
- [10] H. W. Walling, S. W. Fosko, P. A. Geraminejad, D. C. Whitaker, and C. J. Arpey, “Aggressive basal cell carcinoma: Presentation, pathogenesis, and management,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 23, no. 3–4, pp. 389–402, 2004, doi: 10.1023/B:CANC.0000031775.04618.30.
- [11] V. Lago, L. Minig, and C. Fotopoulou, “Incidence of Lymph Node Metastases in Apparent Early-Stage Low-Grade Epithelial Ovarian Cancer: A Comprehensive Review,” *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 26, no. 8, pp. 1407–1414, Oct. 2016, doi: 10.1097/IGC.0000000000000787.
- [12] G. Stanta and S. Bonin, “Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity,” *Front. Med.*, vol. 5, no. APR, p. 352094, Apr. 2018, doi: 10.3389/FMED.2018.00085/BIBTEX.
- [13] M. Jamal-Hanjani, S. A. Quezada, J. Larkin, and C. Swanton, “Translational Implications of Tumor Heterogeneity CME Staff Planners’ Disclosures,” *Clin Cancer Res*, vol. 21, no. 6, 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1429.
- [14] D. Albert *et al.*, *Dorland’s Illustrated Medical Dictionary*. Elsevier Saunders, 2012.
- [15] P. Collin, *Dictionary of Medical Terms*, 4th ed. London: A&C Black, 2004.
- [16] T. W. Sadler, *Langman’s Medical Embriology*, 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019.
- [17] A. Wolff, Ed., *Britannica concise encyclopedia*. Encyclopaedia Britannica, INC, 2006.
- [18] L. P. Bignold, *Principles of tumors: A translational approach to foundations*, 2nd ed. Oxford: Elsevier Inc., 2020. doi: 10.1016/C2018-0-01190-1.
- [19] S. R. y Cajal, P. Huguet, and C. Romagosa, “Uncertain or Unknown Histogenesis Tumors,” in *Encyclopedia of Cancer*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, pp. 4727–4732. doi: 10.1007/978-3-662-46875-3_6105.
- [20] C. Ortiz Hidalgo, “Immunohistochemistry in Historical Perspective: Knowing the Past to Understand the

- Present,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 2422, no. December 2021, pp. 17–31, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-1948-3_2.
- [21] L. L. De Matos, D. C. Trufelli, M. G. L. De Matos, and M. A. Da Silva Pinhal, “Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice,” *Biomark. Insights*, vol. 5, p. BMI.S2185, Jan. 2010, doi: 10.4137/BMI.S2185.
- [22] F. Lin and Z. Chen, “Standardization of diagnostic immunohistochemistry: Literature review and Geisinger experience,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 138, no. 12, pp. 1564–1577, 2014, doi: 10.5858/arpa.2014-0074-RA.
- [23] S. W. Kim, J. Roh, and C. S. Park, “Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips,” *J. Pathol. Transl. Med.*, vol. 50, no. 6, pp. 411–418, 2016, doi: 10.4132/jptm.2016.08.08.
- [24] J. W. Prichard, “Overview of automated immunohistochemistry,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 138, no. 12, pp. 1578–1582, 2014, doi: 10.5858/arpa.2014-0083-RA.
- [25] N. Sukswai and J. D. Khoury, “Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection,” *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, vol. 14, no. 5, pp. 368–375, 2019, doi: 10.1007/s11899-019-00533-9.
- [26] R. A. Walker, “Quantification of immunohistochemistry - Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I,” *Histopathology*, vol. 49, no. 4, pp. 406–410, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02514.x.
- [27] D. G. Poalelungi *et al.*, “Revolutionizing Pathology with Artificial Intelligence: Innovations in Immunohistochemistry,” *J. Pers. Med.*, vol. 14, no. 7, p. 693, 2024, doi: 10.3390/jpm14070693.
- [28] B. Acs, M. Rantalainen, and J. Hartman, “Artificial intelligence as the next step towards precision pathology,” *J. Intern. Med.*, vol. 288, no. 1, pp. 62–81, 2020, doi: 10.1111/joim.13030.
- [29] Y. Chong *et al.*, “Diagnosis prediction of tumours of unknown origin using ImmunoGenius, a machine learning-based expert system for immunohistochemistry profile interpretation,” *Diagn. Pathol.*, vol. 16, no. 1, p. 19, 2021, doi: 10.1186/s13000-021-01081-8.
- [30] V. H. Koelzer, K. Sirinukunwattana, J. Rittscher, and K. D. Mertz, “Precision immunoprofiling by image analysis and artificial intelligence,” *Virchows Arch.*, vol. 474, no. 4, pp. 511–522, 2019, doi: 10.1007/s00428-018-2485-z.
- [31] C. Wittekind and M. Neid, “Cancer invasion and metastasis,” *Oncology*, vol. 69, no. SUPPL. 1, pp. 14–16, 2005, doi: 10.1159/000086626.
- [32] Q. Liu, H. Zhang, X. Jiang, C. Qian, Z. Liu, and D. Luo, “Factors involved in cancer metastasis: A better understanding to ‘seed and soil’ hypothesis,” *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0742-4.
- [33] M. Riihimäki, H. Thomsen, K. Sundquist, J. Sundquist, and K. Hemminki, “Clinical landscape of cancer metastases,” *Cancer Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 5534–5542, 2018, doi: 10.1002/cam4.1697.
- [34] J. Budczies *et al.*, “The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 1, pp. 570–583, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.2677.
- [35] J. R. Conner and J. L. Hornick, “Metastatic Carcinoma of Unknown Primary,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 22, no. 3, pp. 149–167, 2015, doi: 10.1097/pap.0000000000000069.
- [36] N. Pavlidis and G. Pentheroudakis, “Cancer of unknown primary site,” *Lancet*, vol. 379, no. 9824, pp. 1428–1435, 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61178-1.
- [37] N. Pavlidis, E. Briasoulis, J. Hainsworth, and F. A. Greco, “Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary,” *Eur. J. Cancer*, vol. 39, no. 14, pp. 1990–2005, 2003, doi: 10.1016/S0959-8049(03)00547-1.

- [38] S. Roy, I. Das, A. De (Pati), and A. Nandi, “Metastatic carcinoma with unknown primary – does immunohistochemistry help to detect origin?,” *Sch. J. Appl. Med. Sci.*, vol. 4, no. 7, pp. 2468–2473, 2016, doi: 10.21276/sjams.2016.4.7.33.
- [39] D. Montezuma, R. Azevedo, and P. Lopes, “A panel of four immunohistochemical markers (CK7 , CK20 , TTF-1 , and p63) allows accurate diagnosis of primary and metastatic lung carcinoma on biopsy specimens,” pp. 749–754, 2013, doi: 10.1007/s00428-013-1488-z.
- [40] J. I. Epstein, L. Egevad, P. A. Humphrey, and R. Montironi, “Best Practices Recommendations in the Application of Immunohistochemistry in the Prostate,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 38, no. 8, pp. e6–e19, Aug. 2014, doi: 10.1097/PAS.000000000000238.
- [41] A. M. Gown, “Diagnostic immunohistochemistry: What can go wrong and how to prevent it,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 140, no. 9, pp. 893–898, 2016, doi: 10.5858/arpa.2016-0119-RA.
- [42] E. B. Stelow and H. Yaziji, “Immunohistochemistry, carcinomas of unknown primary, and incidence rates,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 35, no. 2, pp. 143–152, 2018, doi: 10.1053/j.semdp.2017.11.012.
- [43] J. Selves, E. Long-mira, M. Mathieu, P. Rochaix, and M. Ili, “Immunohistochemistry for Diagnosis of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary Site,” *Cancers (Basel)*, vol. 108, no. 10, pp. 1–23, 2018, doi: 10.3390/cancers10040108.
- [44] M. Dong *et al.*, “Sex differences in cancer incidence and survival: a pan-cancer analysis,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 29, no. 7, pp. 1389–1397, 2020, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-0036.
- [45] X. Huang, C. Shu, L. Chen, and B. Yao, “Impact of sex, body mass index and initial pathologic diagnosis age on the incidence and prognosis of different types of cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 40, no. 3, pp. 1359–1369, 2018, doi: 10.3892/or.2018.6529.
- [46] N. R. A. Palmer, A. M. Geiger, L. Lu, L. D. Case, and K. E. Weaver, “Impact of rural residence on forgoing healthcare after cancer because of cost,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 22, no. 10, pp. 1668–1676, 2013, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0421.
- [47] S. Yuan and S. H. Xie, “Urban–rural disparity in cancer incidence in China, 2008–2012: A cross-sectional analysis of data from 36 cancer registers,” *BMJ Open*, vol. 11, no. 4, pp. 2008–2012, 2021, doi: 10.1136/bmjopen-2020-042762.
- [48] J. Thakur *et al.*, “Urban–rural differences in cancer incidence and pattern in Punjab and Chandigarh: Findings from four new population-based cancer registries in North India,” *Int. J. Noncommunicable Dis.*, vol. 2, no. 2, p. 49, 2017, doi: 10.4103/jncd.jncd_11_17.
- [49] “National Cancer Institute. GIS Portal for Cancer Research. Rural-Urban Disparities in Cancer.” <https://gis.cancer.gov/mapstory/rural-urban/index.html> (accessed Apr. 06, 2024).
- [50] M. Fortin, G. Bravo, C. Hudon, A. Vanasse, and L. Lapointe, “Prevalence of multimorbidity among adults seen in family practice,” *Ann. Fam. Med.*, vol. 3, no. 3, pp. 223–228, 2005, doi: 10.1370/afm.272.
- [51] I. Schäfer *et al.*, “The influence of age, gender and socio-economic status on multimorbidity patterns in primary care. first results from the multicare cohort study,” *BMC Health Serv. Res.*, vol. 12, no. 1, p. 89, Dec. 2012, doi: 10.1186/1472-6963-12-89.
- [52] C. M. Boyd and M. Fortin, “Future of multimorbidity research: How should understanding of multimorbidity inform health system design?,” *Public Health Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 451–474, 2011.
- [53] K. Barnett, S. W. Mercer, M. Norbury, G. Watt, S. Wyke, and B. Guthrie, “Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: A cross-sectional study,” *Lancet*, vol. 380, no. 9836, pp. 37–43, 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60240-2.
- [54] L. D. Hughes, M. E. T. McMurdo, and B. Guthrie, “Guidelines for people not for diseases: The challenges of applying UK clinical guidelines to people with multimorbidity,” *Age Ageing*, vol. 42, no. 1, pp. 62–69, 2013, doi: 10.1093/ageing/afs100.

- [55] D. Li, J. Shi, X. Dong, D. Liang, J. Jin, and Y. He, “Epidemiological characteristics and risk factors of lung adenocarcinoma: A retrospective observational study from North China,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. August, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.892571.
- [56] M. Y. A. M. Noone, N. Howlader, M. Krapcho, D. Miller, A. Brest, “SEER cancer statistics review, 1975–2015,” Bethesda, MD, 2018.
- [57] A. Shin, C. M. Oh, B. W. Kim, H. Woo, Y. J. Won, and J. S. Lee, “Lung cancer epidemiology in Korea,” *Cancer Res. Treat.*, vol. 49, no. 3, pp. 616–626, 2017, doi: 10.4143/crt.2016.178.
- [58] T. John *et al.*, “Lung Cancer in Australia,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1809–1814, 2020, doi: 10.1016/j.jtho.2020.09.005.
- [59] Z. Lu *et al.*, “Systematic Review, Meta-Analysis and Bioinformatic Analysis of Biomarkers for Prognosis of Malignant Pleural Mesothelioma,” *Diagnostics*, vol. 12, no. 9, 2022, doi: 10.3390/diagnostics12092210.
- [60] D. R. Fels Elliott and K. D. Jones, “Diagnosis of Mesothelioma,” *Surg. Pathol. Clin.*, vol. 13, no. 1, pp. 73–89, 2020, doi: 10.1016/j.path.2019.10.001.
- [61] O. Chimed-Ochir, D. Arachi, T. Driscoll, R. T. Lin, J. Takala, and K. Takahashi, “Burden of mesothelioma deaths by national income category: Current status and future implications,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 17, no. 18, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3390/ijerph17186900.
- [62] S. Angori, J. Lobo, and H. Moch, “Papillary renal cell carcinoma: current and controversial issues,” *Curr. Opin. Urol.*, vol. 32, no. 4, pp. 344–351, 2022, doi: 10.1097/MOU.0000000000001000.
- [63] S. Adeberg *et al.*, “Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) With Carbon Ion Boost in the Multimodal Treatment of Salivary Duct Carcinoma,” *Front. Oncol.*, vol. 9, no. December, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.01420.
- [64] D. Voduc, M. Cheang, and T. Nielsen, “GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 17, no. 2, pp. 365–373, 2008, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-1090.
- [65] A. M. Gown, R. S. Fulton, and P. L. Kandalaf, “Markers of metastatic carcinoma of breast origin,” *Histopathology*, vol. 68, no. 1, pp. 86–95, 2016, doi: 10.1111/his.12877.
- [66] R. Asch-Kendrick and A. Cimino-Mathews, “The role of GATA3 in breast carcinomas: A review,” *Hum. Pathol.*, vol. 48, pp. 37–47, 2016, doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.035.
- [67] S. M. Wendroth, M. J. Mentrikoski, and M. R. Wick, “GATA3 expression in morphologic subtypes of breast carcinoma: A comparison with gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin,” *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 19, no. 1, pp. 6–9, 2015, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2014.12.001.
- [68] G. Krings, M. Nystrom, I. Mehdi, P. Vohra, and Y. Y. Chen, “Diagnostic utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer,” *Hum. Pathol.*, vol. 45, no. 11, pp. 2225–2232, 2014, doi: 10.1016/j.humpath.2014.06.022.
- [69] G. Acs, T. J. Lawton, T. R. Rebbeck, V. A. LiVolsi, and P. J. Zhang, “Differential Expression of E-Cadherin in Lobular and Ductal Neoplasms of the Breast and Its Biologic and Diagnostic Implications,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 115, no. 1, pp. 85–98, 2001, doi: 10.1309/FDHX-L92R-BATQ-2GE0.
- [70] N. S. Goldstein, D. Bassi, J. C. Watts, L. J. Layfield, H. Yaziji, and A. M. Gown, “E-cadherin reactivity of 95 noninvasive ductal and lobular lesions of the breast: Implications for the interpretation of problematic lesions,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 115, no. 4, pp. 534–542, 2001, doi: 10.1309/B0DD-4M7H-GJG1-7KCW.
- [71] H. S. Qureshi, A. H. Ormsby, M. W. Lee, R. J. Zarbo, and C. K. Ma, “The diagnostic utility of p63, CK5/6, CK 7, and CK 20 in distinguishing primary cutaneous adnexal neoplasms from metastatic carcinomas,” *J. Cutan. Pathol.*, vol. 31, no. 2, pp. 145–152, 2004, doi: 10.1111/j.0303-6987.2004.00147.x.
- [72] M. Levrero *et al.*, “The p53/p63/p73 family of transcription factors: Overlapping and distinct functions,” *J.*

- Cell Sci.*, vol. 113, no. 10, pp. 1661–1670, 2000, doi: 10.1242/jcs.113.10.1661.
- [73] A. Yang *et al.*, “P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development,” *Nature*, vol. 398, no. 6729, pp. 714–718, 1999, doi: 10.1038/19539.
- [74] V. De Laurenzi *et al.*, “p63 and p73 Transactivate Differentiation Gene Promoters in Human Keratinocytes,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 273, no. 1, pp. 342–346, Jun. 2000, doi: 10.1006/BBRC.2000.2932.
- [75] S. J. Ohsie, G. P. Sarantopoulos, A. J. Cochran, and S. W. Binder, “Immunohistochemical characteristics of melanoma,” *J. Cutan. Pathol.*, vol. 35, no. 5, pp. 433–444, 2008, doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x.
- [76] D. Nonaka, J. Laser, R. Tucker, and J. Melamed, “Immunohistochemical evaluation of necrotic malignant melanomas,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 127, no. 5, pp. 787–791, 2007, doi: 10.1309/WKEN4ER9GXJ9GG31.
- [77] L. E. Davis, S. C. Shalin, and A. J. Tackett, “Current state of melanoma diagnosis and treatment,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 20, no. 11, pp. 1366–1379, 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1640032.
- [78] E. Saliba and J. Bhawan, “Aberrant Expression of Immunohistochemical Markers in Malignant Melanoma: A Review,” *Dermatopathology*, vol. 8, no. 3, pp. 359–370, 2021, doi: 10.3390/dermatopathology8030040.
- [79] R. A. Fayne, F. I. MacEdo, S. E. Rodgers, and M. G. Möller, “Evolving management of positive regional lymph nodes in melanoma: Past, present and future directions,” *Oncol. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 175–182, 2019, doi: 10.4081/ONCOL.2019.433.
- [80] H. A. B. Mulhaupt, J. N. Fessler, and M. J. Warhol, “Loss of high-molecular-weight cytokeratin antigenicity in prostate tissue obtained by transurethral resections,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 124, no. 12, pp. 1764–1767, 2000, doi: 10.5858/2000-124-1764-lohmwc.
- [81] M. A. Rubin *et al.*, “Rapid (‘warm’) autopsy study for procurement of metastatic prostate cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 1038–45, Mar. 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741732>
- [82] M. Varma, M. D. Linden, and M. B. Amin, “Effect of formalin fixation and epitope retrieval techniques on antibody 34betaE12 immunostaining of prostatic tissues,” *Mod. Pathol.*, vol. 12, no. 5, pp. 472–8, May 1999, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349984>
- [83] J. Luo *et al.*, “Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer,” *Cancer Res.*, vol. 62, no. 8, pp. 2220–6, Apr. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956072>
- [84] C. A. Rubin M.A., Zhou M., Dhanasekaran S.M., Varambally S., Barrette T.R., Sanda M.G., Pienta K.J., Ghosh D., “ α -Methylacyl Coenzyme A Racemase as a Tissue Biomarker for Prostate Cancer,” *JAMA*, vol. 287, no. 13, pp. 1662–1670, Apr. 2002, doi: 10.1001/jama.287.13.1662.
- [85] N. Jiang, S. Zhu, J. Chen, Y. Niu, and L. Zhou, “A-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) and Prostate-Cancer Risk: A Meta-Analysis of 4,385 Participants,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–6, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0074386.
- [86] N. Rekhtman, D. C. Ang, C. S. Sima, W. D. Travis, and A. L. Moreira, “Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens,” *Mod. Pathol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1348–1359, 2011, doi: 10.1038/modpathol.2011.92.
- [87] K. S. Aulakh, C. D. Chisholm, D. A. Smith, and V. O. Speights, “TTF-1 and napsin a do not differentiate metastatic lung adenocarcinomas from primary esophageal adenocarcinomas: Proposal of a novel staining panel,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 137, no. 8, pp. 1094–1098, 2013, doi: 10.5858/arpa.2012-0305-OA.
- [88] M. Wu *et al.*, “p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 119, no. 5, pp. 696–702, May 2003, doi: 10.1309/P5AB-R5KQ-89RN-JTFH.

- [89] L. Righi *et al.*, “Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology,” *Cancer*, vol. 117, no. 15, pp. 3416–3423, Aug. 2011, doi: 10.1002/cncr.25830.
- [90] L. F. Surrey, R. Frank, P. J. Zhang, and E. E. Furth, “TTF-1 and Napsin-A are expressed in a subset of cholangiocarcinomas arising from the gallbladder and hepatic ducts: Continued caveats for utilization of immunohistochemistry panels,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 38, no. 2, pp. 224–227, 2014, doi: 10.1097/PAS.0000000000000138.
- [91] M. H. Ao *et al.*, “The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer,” *Hum. Pathol.*, vol. 45, no. 5, pp. 926–934, 2014, doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.005.
- [92] J. A. Bishop, R. Sharma, and P. B. Illei, “Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma,” *Hum. Pathol.*, vol. 41, no. 1, pp. 20–25, 2010, doi: 10.1016/j.humpath.2009.06.014.
- [93] N. Fatima, C. Cohen, D. Lawson, and M. T. Siddiqui, “TTF-1 and napsin a double stain: A useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell blocks,” *Cancer Cytopathol.*, vol. 119, no. 2, pp. 127–133, 2011, doi: 10.1002/cncy.20135.
- [94] L. M. Stoll, M. W. Johnson, E. Gabrielson, F. Askin, D. P. Clark, and Q. K. Li, “The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas,” *Cancer Cytopathol.*, vol. 118, no. 6, pp. 441–449, 2010, doi: 10.1002/cncy.20108.
- [95] A. Curioni-Fontecedro, D. Soldini, B. Seifert, T. Eichmueller, and D. Korol, “A Comprehensive Analysis of Markers for Neuroendocrine Tumors of the Lungs Demonstrates Estrogen Receptor Beta to be a Prognostic Markers in SCLC Male Patients,” *J. Cytol. Histol.*, vol. 05, no. 05, 2014, doi: 10.4172/2157-7099.1000268.
- [96] X. Wang *et al.*, “Prognostic and Predictive Value of Thyroid Transcription Factor-1, CD56, P40 and Other Clinical Characteristics in Small Cell Lung Cancer Patients,” *Chinese J. lung cancer*, vol. 20, no. 8, pp. 522–527, Aug. 2017, doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2017.08.04.
- [97] J. Feng *et al.*, “Correlation of neuroendocrine features with prognosis of nonsmall cell lung cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 44, pp. 71727–71736, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12327.
- [98] P. G. Chu and L. M. Weiss, “Keratin expression in human tissues and neoplasms,” *Histopathology*, vol. 40, no. 5, pp. 403–439, May 2002, doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x.
- [99] D. K. McGregor, T. T. Wu, A. Rashid, R. Luthra, and S. R. Hamilton, “Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 28, no. 6, pp. 712–718, 2004, doi: 10.1097/01.pas.0000126757.58474.12.
- [100] R. W. Werling, H. Yaziji, C. E. Bacchi, and A. M. Gown, “CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: An immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 27, no. 3, pp. 303–310, 2003, doi: 10.1097/00000478-200303000-00003.
- [101] R. Vang *et al.*, “Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: Comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7,” *Mod. Pathol.*, vol. 19, no. 11, pp. 1421–1428, 2006, doi: 10.1038/modpathol.3800698.
- [102] G. Tan *et al.*, “Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm,” *Indian J. Pathol. Microbiol.*, vol. 53, no. 1, p. 1, 2010, doi: 10.4103/0377-4929.59173.
- [103] H. Li *et al.*, “A combination of cytokeratin 5/6, p63, p40 and MUC5AC are useful for distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the cervix,” *Diagn. Pathol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1186/s13000-020-01018-7.

- [104] M. Köbel *et al.*, “Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry,” *Histopathology*, vol. 64, no. 7, pp. 1004–1013, 2014, doi: 10.1111/his.12349.
- [105] M. Köbel *et al.*, “Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma,” *J. Pathol. Clin. Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 247–258, 2016, doi: 10.1002/cjp2.53.
- [106] S. Chen *et al.*, “Beside P53 and PTEN: Identification of molecular alterations of the RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas to determine potential novel therapeutic targets,” *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 5, pp. 3264–3272, 2016, doi: 10.3892/ol.2016.5083.
- [107] E. Luporsi *et al.*, “Ki-67: Level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: Analytical and critical review,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 132, no. 3, pp. 895–915, 2012, doi: 10.1007/s10549-011-1837-z.
- [108] K. D. Awadelkarim, R. Mariani-Costantini, I. Osman, and M. C. Barberis, “Ki-67 Labeling Index in Primary Invasive Breast Cancer from Sudanese Patients: A Pilot Study,” *ISRN Pathol.*, vol. 2012, pp. 1–6, 2012, doi: 10.5402/2012/232171.
- [109] D. K. Sa and P. Kumar, “Clinicopathological consistency in diagnosis of skin disorders: A retrospective study of 371 histopathology reports,” *J. Pakistan Assoc. Dermatologists*, vol. 26, no. 2, pp. 96–98, 2016, [Online]. Available: <https://www.jpapad.com.pk/index.php/jpad/article/view/48>
- [110] C. Aslan, F. Göktay, A. T. Mansur, I. E. Aydingöz, P. Güneş, and T. R. Ekmekçi, “Clinicopathological consistency in skin disorders: A retrospective study of 3949 pathological reports,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 66, no. 3, pp. 393–400, 2012, doi: 10.1016/j.jaad.2010.12.031.
- [111] C. Korfitis, S. Gregoriou, C. Antoniou, A. D. Katsambas, and D. Rigopoulos, “Skin biopsy in the context of dermatological diagnosis: A retrospective cohort study,” *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/734906.
- [112] I. Palamaras, M. Hamill, G. Sethi, D. Wilkinson, and H. Lamba, “The usefulness of a diagnostic biopsy clinic in a genitourinary medicine setting: Recent experience and a review of the literature,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 20, no. 8, pp. 905–910, 2006, doi: 10.1111/j.1468-3083.2006.01563.x.
- [113] K. Sellheyer and W. F. Bergfeld, “A retrospective biopsy study of the clinical diagnostic accuracy of common skin diseases by different specialties compared with dermatology,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 52, no. 5, pp. 823–830, 2005, doi: 10.1016/j.jaad.2004.11.072.
- [114] E. A. Morris, L. Liberman, S. G. Trevisan, A. F. Abramson, and D. D. Dershaw, “Histologic heterogeneity of masses at percutaneous breast biopsy,” *Breast J.*, vol. 8, no. 4, pp. 187–191, 2002, doi: 10.1046/j.1524-4741.2002.08305.x.
- [115] Z. K. Arbiser, A. L. Folpe, and S. W. Weiss, “Consultative (expert) second opinions in soft tissue pathology: Analysis of problem-prone diagnostic situations,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 116, no. 4, pp. 473–476, 2001, doi: 10.1309/425H-NW4W-XC9A-005H.
- [116] K. Thway and C. Fisher, “Histopathological diagnostic discrepancies in soft tissue tumours referred to a specialist centre,” *Sarcoma*, vol. 2009, 2009, doi: 10.1155/2009/741975.
- [117] A. Lurkin *et al.*, “Epidemiological evaluation of concordance between initial diagnosis and central pathology review in a comprehensive and prospective series of sarcoma patients in the Rhone-Alpes region,” *BMC Cancer*, vol. 10, 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-150.
- [118] I. Ray-Coquard *et al.*, “Sarcoma: Concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions,” *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 9, pp. 2442–2449, 2012, doi: 10.1093/annonc/mdr610.
- [119] H. Wellauer, G. Studer, B. Bode-Lesniewska, and B. Fuchs, “Time and Accuracy to Establish the Diagnosis of Soft Tissue Tumors: A Comparative Analysis from the Swiss Sarcoma Network,” *Sarcoma*, vol. 2022,

2022, doi: 10.1155/2022/7949549.

- [120] J. Y. Blay *et al.*, “Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients,” *Ann. Oncol.*, vol. 28, no. 11, pp. 2852–2859, 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx484.
- [121] B. R. DeYoung and M. R. Wick, “Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: an algorithmic approach,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 17, no. 3, pp. 184–93, Aug. 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10968704>
- [122] P. L. Kandalaft and A. M. Gown, “Practical applications in immunohistochemistry: Carcinomas of unknown primary site,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 140, no. 6, pp. 508–523, 2016, doi: 10.5858/arpa.2015-0173-CP.
- [123] F. Lin and J. Prichard, Eds., *Handbook of practical immunohistochemistry : frequently asked questions*, 2nd ed. New York: Springer, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-1578-1_2.
- [124] Z. H. Chen, L. Lin, C. F. Wu, C. F. Li, R. H. Xu, and Y. Sun, “Artificial intelligence for assisting cancer diagnosis and treatment in the era of precision medicine,” *Cancer Commun.*, vol. 41, no. 11, pp. 1100–1115, 2021, doi: 10.1002/cac2.12215.
- [125] D. Bertsimas and H. Wiberg, “Machine Learning in Oncology: Methods, Applications, and Challenges,” *JCO Clin. Cancer Informatics*, no. 4, pp. 885–894, 2020, doi: 10.1200/cci.20.00072.
- [126] T. Chen and C. Guestrin, “XGBoost: A scalable tree boosting system,” in *Proceedings of the ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, 2016, pp. 785–794. doi: 10.1145/2939672.2939785.
- [127] R. Yacouby and D. Axman, “Probabilistic Extension of Precision, Recall, and F1 Score for More Thorough Evaluation of Classification Models,” in *Proceedings of the First Workshop on Evaluation and Comparison of NLP Systems*, 2020, pp. 79–91. doi: 10.18653/v1/2020.eval4nlp-1.9.
- [128] A. Hage Chehade, N. Abdallah, J.-M. Marion, M. Oueidat, and P. Chauvet, “Lung and colon cancer classification using medical imaging: a feature engineering approach,” *Phys. Eng. Sci. Med.*, vol. 45, no. 3, pp. 729–746, Sep. 2022, doi: 10.1007/s13246-022-01139-x.
- [129] W. Liu, S. Wang, Z. Ye, P. Xu, X. Xia, and M. Guo, “Prediction of lung metastases in thyroid cancer using machine learning based on SEER database,” *Cancer Med.*, vol. 11, no. 12, pp. 2503–2515, 2022, doi: 10.1002/cam4.4617.
- [130] Y. Li *et al.*, “Prediction of lung cancer risk in Chinese population with genetic-environment factor using extreme gradient boosting,” *Cancer Med.*, vol. 11, no. 23, pp. 4469–4478, Dec. 2022, doi: 10.1002/cam4.4800.
- [131] Y. Chong *et al.*, “A machine-learning expert-supporting system for diagnosis prediction of lymphoid neoplasms using a probabilistic decision-tree algorithm and immunohistochemistry profile database,” *J. Pathol. Transl. Med.*, vol. 54, no. 6, pp. 462–470, 2020, doi: 10.4132/JPTM.2020.07.11.
- [132] W. Jiao *et al.*, “A deep learning system accurately classifies primary and metastatic cancers using passenger mutation patterns,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 728, 2020, doi: 10.1038/s41467-019-13825-8.
- [133] K. P. Soh, E. Szczurek, T. Sakoparnig, and N. Beerenwinkel, “Predicting cancer type from tumour DNA signatures,” *Genome Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1186/s13073-017-0493-2.
- [134] D. Lu *et al.*, “Machine Learning Models to Predict Primary Sites of Metastatic Cervical Carcinoma From Unknown Primary,” *Front. Genet.*, vol. 11, p. 614823, Dec. 2020, doi: 10.3389/fgene.2020.614823.
- [135] S. Kang *et al.*, “CancerLocator: Non-invasive cancer diagnosis and tissue-of-origin prediction using methylation profiles of cell-free DNA,” *Genome Biol.*, vol. 18, no. 1, p. 53, 2017, doi: 10.1186/s13059-017-1191-5.
- [136] X. Hao *et al.*, “DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers,” *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 28, pp. 7414–7419, 2017, doi: 10.1073/pnas.1703577114.
- [137] S. Ramaswamy *et al.*, “Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 15149–15154, 2001, doi: 10.1073/pnas.211566398.
- [138] L. Nguyen, A. Van Hoeck, and E. Cuppen, “Machine learning-based tissue of origin classification for cancer of unknown primary diagnostics using genome-wide mutation features,” *Nat. Commun.*, vol. 13, p. 4013, 2022, doi: 10.1038/s41467-022-31666-w.
- [139] A. M. Marquard *et al.*, “TumorTracer: A method to identify the tissue of origin from the somatic mutations of a tumor specimen,” *BMC Med. Genomics*, vol. 8, p. 58, 2015, doi: 10.1186/s12920-015-0130-0.
- [140] J. M. T. Moran *et al.*, “Large nuclear size correlated with better overall survival, Merkel cell polyomavirus positivity, and terminal deoxynucleotidyl transferase expression in Merkel cell carcinoma,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 84, no. 2, pp. 550–552, 2021, doi: 10.1016/j.jaad.2020.05.125.
- [141] P. Faridi, H. Danyali, M. S. Helfroush, and M. A. Jahromi, “An automatic system for cell nuclei pleomorphism segmentation in histopathological images of breast cancer,” in *2016 IEEE Signal Processing in Medicine and Biology Symposium (SPMB)*, Dec. 2016, pp. 1–5. doi: 10.1109/SPMB.2016.7846861.