

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Incidența instabilității
microsatelitare de tip înalt sau a
deficienței sistemului de
reparare al ADN în cancerele
digestive și ginecologice

Doctorand **Flaviu Pițu**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Nadim Al Hajjar**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Instabilitatea microsateleților	19
1.1. Microsateleții și MSI	19
1.2. Sistemul de reparare al ADN	21
1.3. Încărcătura mutațională tumorală	23
1.3.1. Concordanța MSI-dMMR	24
1.3.2. Relația dintre MSI și TMB	25
1.4. Metode de detecție a instabilității microsateleților	26
1.4.1. Imunohistochimia	26
1.4.2. Reacția de polimerizare în lanț și electroforeza capilară	27
1.4.3. Secvențierea paralelă masivă a ADN	28
1.4.4. Analiza moleculară prin inversie	29
2. Opțiuni terapeutice în tumorile MSI-H/dMMR	31
2.1. Date generale	31
2.2. Inhibitori ai sistemului imunitar de control	31
2.2.1. CTLA 4	33
2.2.2. PD-1 și PD-L1	34
2.3. Asocieri terapeutice și direcții de viitor	36
3. Aplicații clinice ale MSI	39
3.1. Introducere	39
3.2. Tumori digestive	39
3.2.1. Cancerul colo-rectal	39
3.2.1.1. Sindromul Lynch	43
3.2.2. Cancerul gastric	44
3.2.3. Cancerul pancreatic	47
3.2.4. Cancerul hepato-biliar	49
3.2.5. Cancerul esofagian	50
3.3. Tumori ginecologice	51
3.3.1. Cancerul de endometru	53
3.3.2. Cancerul de sân	54
3.3.3. Cancerul ovarian	54
3.3.4. Cancerul cervical	55
3.4. Concluzii	
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	59
2. Metodologie generală	60
3. Studiul 1 - Importanța MLH1, MSH2, MSH6 și PMS2 în determinarea răspunsului la alterarea ADN în cancerele digestive	61

3.1. Introducere	61
3.2. Material și metodă	62
3.3. Rezultate și discuții	62
3.4. Concluzii	67
4. Studiul 2 - Screening pentru pacienții oncologici care ar putea beneficia de efectele imunoterapiei	69
4.1. Introducere	69
4.2. Material și metodă	69
4.3. Rezultate	70
4.4. Discuții	74
4.5. Concluzii	75
5. Studiul 3 - Incidența MSI-H în cancerele digestive și ginecologice. Corelații anatomo-clinice	77
5.1. Introducere	77
5.2. Material și metodă	78
5.3. Rezultate	79
5.3.1. Cancer digestive	79
5.3.1.1. Cancerul colo-rectal	79
5.3.1.2. Cancerul gastric	89
5.3.1.3. Cancerul pancreatic	93
5.3.1.4. Status MSI în cancerele digestive	93
5.3.2. Cancer ginecologice	93
5.3.2.1. Cancerul de ovar	93
5.3.2.2. Cancerul de sân	94
5.3.2.3. Cancerul de endometru	94
5.3.2.4. Cancerul de col uterin și vulvă	94
5.3.2.5. Status MSI în cancerele ginecologice	94
5.4. Discuții	95
5.5. Concluzii	97
6. Discuții generale	99
7. Concluzii generale	101
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	103
REFERINȚE	105

Cuvinte cheie: instabilitate genomică, MSI-H, imunoterapie, cancer digestive, cancer ginecologice

Introducere. Obiective generale

Patologia oncologică digestivă și ginecologică face parte dintre cele mai importante probleme de sănătate publică pe plan global, din cauza incidenței și a mortalității crescute. Deși terapia chirurgicală reprezintă singura opțiune cu intenție curativă în aceste malignități, în foarte multe cazuri, din cauza diagnosticării într-un stadiu avansat, acest tratament, cel puțin de primă intenție, nu este posibil. Cu scopul obținerii unui efect antitumoral cât mai bun, uneori chiar de a converti la rezecabilitate un caz inițial inoperabil, contracarând mecanisme și exploataând biomarkeri implicați în oncogeneză, chimioterapia a cunoscut o dezvoltare constantă, cu o eficacitate tot mai bună în ultimul timp. Cu toate acestea, în unele cazuri, rezultatele sunt nesatisfăcătoare, chimioterapia având o influență minimă asupra evoluției naturale a bolii.

În încercarea de a crește eficacitatea terapiei în diverse tipuri de cancer, de-a lungul timpului au fost studiați o serie de biomarkeri, cu valoare însă limitată a predictibilității în ceea ce privește răspunsul și evoluția acestor pacienți. În ultimii ani, instabilitatea microsatelitară în cancer a devenit un biomarker cu o importanță clinică relevantă în alegerea tratamentului și prognosticul pacienților oncologici. Instabilitatea microsatelitară de tip înalt (MSI-H) sau deficiența sistemului de reparare al ADN (dMMR) reprezintă biomarkeri intens studiați în patologia malignă, aceștia reflectând existența unui status hipermutațional, ceea ce determină inițierea procesului de oncogeneză.

S-a demonstrat că tumorile ce exprimă instabilitate microsatelitară de tip înalt au o imunogenicitate crescută, caracterizată printr-un infiltrat inflamator tumoral și peritumoral mai exprimat, dar și printr-un răspuns terapeutic mai bun la imunoterapie. În ultimii ani, imunoterapia a reprezentat o preocupare importantă în oncologie, obținându-se rezultate promițătoare, uneori cu răspunsuri de durată, în tratamentul mai multor cancere, cum sunt melanomul, cancerul pulmonar, renal dar și în cazul unor tumori cu instabilitate microsatelitară. Prin imunoterapie se încearcă menținerea homeostaziei sistemului imunitar și contracararea supresiei răspunsului imun indusă de tumoră. Cu toate că imunoterapia și-a dovedit eficiența în oncologie, doar un anumit grup al pacienților neoplazici răspund la acest tratament. Determinarea unor biomarkeri cu valoare predictivă pentru răspunsul la imunoterapie reprezintă un punct cheie în creșterea eficienței tratamentului acestor pacienți. Un exemplu ce evidențiază impactul MSI-H în oncologie este reprezentat de aprobarea în anul 2017 de către Agenția Americană a Alimentelor și a Medicamentelor (FDA) a utilizării imunoterapiei pentru tratamentul pacienților adulți și pediatrici cu tumori solide nerezecabile sau metastatice ce exprimă MSI-H/dMMR, indiferent de țesutul de origine, tumori ce nu au răspuns la tratamentul convențional inițial. Acest lucru a constituit un element de noutate în oncologie, fiind pentru prima dată când niște

biomarkeri independenți de țesutul tumoral de origine sunt folosiți în alegerea terapiei anticanceroase. Cu toate că în cancerul colorectal au fost publicate numeroase studii în ceea ce privește incidența și implicațiile terapeutice ale instabilității microsatelitare, există puține date referitoare la alte malignități.

Pornind de la aceste premize, lucrarea de față și-a propus să determine incidența MSI-H/dMMR în cele mai frecvente malignități chirurgicale digestive și ginecologice, în Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia, dar și caracteristicile clinico-patologice ale tumorilor cu acest profil molecular, cu scopul de a evidenția potențiale corelații semnificative cu aplicabilitate clinică în aceste patologii.

În prima parte a lucrării s-a realizat o trecere în revistă a informațiilor relevante referitoare la cunoașterea actuală în ceea ce privește instabilitatea microsatelitară, opțiunile terapeutice și aplicabilitatea clinică în cancerele digestive și ginecologice cu acest profil molecular. Cea de-a doua parte a tezei reprezintă contribuția personală și a fost structurată în trei studii.

Contribuția personală

Pentru realizarea obiectivelor propuse s-au avut în vedere mai multe etape metodologice. Documentarea teoretică s-a realizat prin căutarea electronică a celor mai importante publicații în domeniu până în luna ianuarie 2021, utilizând platforma PubMed.

Pentru studierea modificărilor genetice comune în cazul cancerelor digestive ce prezintă instabilitate genomică și determinarea proceselor biologice în care acestea sunt implicate, pacienții au fost selectați din MSK Impact Cohort. Datele online au fost descărcate prin intermediul cBioPortal. Au fost incluse în studiu adenocarcinomul colorectal, adenocarcinomul gastroesofagian, adenocarcinomul pancreatic, colangiocarcinomul, neoplazii ce au prezentat mutații ale MLH1, MSH2, MSH6 sau PMS2.

Următorul studiu a fost unul transversal, observațional și analitic. În acest studiu au fost incluși pacienți cu diverse malignități digestive sau ginecologice ce au fost operați în Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia în intervalul august 2018-septembrie 2020. Determinarea statusului MSI s-a realizat prin RT-PCR. Datele referitoare la încărcătura mutațională tumorală și efectele imunoterapiei au fost descărcate utilizând interfața cBioPortal. S-a evaluat valoarea ca metodă de screening pentru pacienții oncologici care ar putea beneficia de efectele imunoterapiei.

În ultimul studiu au fost înrolați 64 de pacienți cu cancer digestive și ginecologice, selectați prospectiv din Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia, secția Chirurgie și secția Ginecologie, care au fost supuși unei intervenții chirurgicale cu intenție de radicalitate sau paliativă. Dintre aceștia 37 au prezentat tumori digestive și alți 27 tumori din sfera ginecologică. Testarea statusului instabilității microsatelitare a

fost făcută pentru toate probele prin trimiterea blocului de parafină și a unei probe de ser la laboratorul de genetică și de patologie moleculară pentru analiza RT-PCR. Adițional, au fost consemnați următorii parametri referitori la fiecare pacient înrolat: vârsta, sex, localizare primară a tumorii, determinări secundare, histologie, stadializare, prezența anemiei și a hipoproteinemiei, intervenția chirurgicală efectuată, evoluția postoperatorie, complicații, supraviețuire. Datele au fost colectate într-o bază de date și prelucrate statistic.

Studiu 1. Importanța MLH1, MSH2, MSH6 și PMS2 în determinarea răspunsului la alterarea ADN în cancerele digestive

Introducere și ipoteza de lucru. Instabilitatea genomică reprezintă o caracteristică frecventă întâlnită în diverse tipuri de cancer la om, care prezintă însă variații în funcție de țesutul de origine, pacient și celularitate în cadrul aceluiași tip tumoral. Aceasta poate fi cauzată de alterări ale sistemului de reparare al ADN, modificări aberante ale histonelor sau metilare. Una dintre metodele cu aplicabilitate clinică în determinarea gradului de instabilitate genomică este determinarea gradului de instabilitate microsatelitară, care a fost pentru prima dată aplicată în cancerul de colon. Datorită indicațiilor curente de identificare a statusului MSI în cazul cancerelor de colon, precum și a frecvenței crescute a cancerelor digestive, am decis să extindem spectrul instabilității genomice la alte cancere din sfera oncologiei digestive.

Scopul acestui studiu a fost de a determina modificările genetice comune în cazul cancerelor digestive ce prezintă instabilitate genomică și de a determina procesele biologice în care acestea sunt implicate.

Material și metodă. Pacienții incluși în studiul de față au fost selectați din MSK Impact Cohort. Datele online au fost descărcate prin intermediul cBioPortal. Au fost incluse în studiu următoarele tipuri de cancere: adenocarcinomul colorectal, adenocarcinomul gastroesofagian, adenocarcinomul pancreatic, colangiocarcinomul, neoplazii ce au prezentat mutații ale MLH1, MSH2, MSH6 sau PMS2. Analiza datelor a fost realizată utilizând R 3.5.3 și PANTHER. Au fost incluse doar procesele GO SLIM ce au avut o rată de evidențiere falsă (false discovery rate- FDR) de sub 0.05. Diagramele Chord au fost generate prin utilizarea circlase R package.

Rezultate. În funcție de genele mutante evidențiate la nivelul blocului de origine tumorală, realizând o comparație în funcție de numărul genelor implicate în tipurile de cancer analizate a fost evidențiat faptul că majoritatea proceselor au fost comune între adenocarcinomul colo-rectal și cel gastro-esofagian, acest lucru semnificând fie anumite procese comune, probabil datorită mecanismelor similare de producere, fie o supraprezentare a acestor tipuri de cancer în cohorta analizată sau prezența unui

număr mare de gene posibil mutante. Luând în considerare genele mutante evidențiate la nivelul originii primare tumorale, care au fost comparate în funcție de gradul de modificare în tipurile de cancer analizate, procesul comun între adenocarcinomul col-rectal, cel gastro-esofagian și colangiocarcinom, cu gradul cel mai mare de modificare, a fost procesul de reparare a erorilor de replicare ale ADN. Luând în considerare genele mutante evidențiate în probele obținute din locurile metastatice, comparându-se numărul de gene modificate în funcție de tipul de cancer, între adenocarcinomul col-rectal și cel gastro-esofagian au fost patru procese ce au arătat suprapunere: procesul celular, reglarea biologică, răspunsul celular la stimuli, procesul metabolic macromolecular. În funcție de genele mutante evidențiate în probele obținute din locurile tumorale metastatice, comparându-se gradul de modificare al acestora în funcție de tipul de cancer, rezultatele au arătat o suprapunere a două procese între colangiocarcinom și adenocarcinomul colo-rectal, reprezentate de regulatorul mitotic G2 al alterării ADN și de regulatorul alterării ADN. Un singur proces comun s-a întâlnit atât la adenocarcinomul colo-rectal cât și la cel gastro-esofagian, și anume procesul de incizie al ADN și repararea exciziei nucleotidice.

Concluzii. Majoritatea proceselor comune au fost evidențiate atunci când a fost luat în considerare numărul genelor implicate în procesele celulare generale, în timp ce atunci când a fost luat în considerare gradul de modificare, cele mai multe suprapuneri au fost reprezentate de alterările mecanismelor de reparare ale ADN, arătând astfel importanța mutațiilor la nivelul MLH1, MSH2, MSH6 și PMS2, independent de tipul de cancer, în alterarea mecanismelor de reparare ale ADN.

Studiu 2. Screening pentru pacienții oncologici care ar putea beneficia de efectele imunoterapiei

Introducere și ipoteza de lucru. Scopul acestui studiu a fost de a determina instabilitatea microsatelitară la nivel local, în cazul unui grup de pacienți oncologici cu cancer ce exprimă MSI-H, și apoi de a evalua eficacitatea imunoterapiei pe baza unei cohorte publice disponibile.

Material și metodă. În studiul prezent am inclus pacienți cu diverse malignități digestive sau ginecologice, ce au fost operați în Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia în intervalul august 2018-septembrie 2020. Testarea MSI s-a realizat de către *Resident Laboratory Oradea*. Un număr de 5 microsateliți au fost folosiți pentru determinare (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27), iar testele au fost efectuate atât din probele tisulare tumorale cât și din probele de țesut normal martor. Dacă nici unul dintre cei 5 markeri nu a arătat instabilitate, tumora a fost considerată MS-stabil (MSS); dacă unul dintre cei cinci markeri a arătat instabilitate, tumora a fost definită ca

și MSI-grad jos (MSI-L), în timp ce dacă instabilitatea a fost prezentă la nivelul a doi sau mai mulți markeri, tumora a fost încadrată ca și MSI-grad înalt (MSI-H). Datele referitoare la încărcătura mutațională tumorală (TMB) și la imunoterapie (MSKCCNatGenet2019) au fost descărcate utilizând interfața cBioPortal Analiza datelor s-a făcut utilizând R 4.0.1. Variabilele categorice au fost reprezentate ca și valoare absolută (procent). Tabelele de contingență au fost analizate utilizând testul Fischer. Luând în considerare numărul mic de pacienți în grupul final, am decis să folosim statistici non-parametrice. Variabilele continue au fost reprezentate ca și mediană (quartila 1, quartila 3). Diferențele dintre două grupuri distribuite non-normal au fost analizate utilizând testul Mann-Whitney-Wilcoxon Rank Sum. Graficele Kaplan Meyer au fost folosite pentru reprezentarea supraviețuirii. Testul Log-rank a fost folosit pentru evaluarea supraviețuirii. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic.

Rezultate și discuții. În studiul de față am observat că cele mai frecvente tipuri de neoplazii care ar putea beneficia de imunoterapie în cazul pacienților cu tumori MSI-H sunt reprezentate de cancerule colorectale. Acest lucru este susținut de faptul că pacienții cu cancer colorectal reprezintă procentul cel mai însemnat între malignitățile tratate în spitalul nostru și care au o prevalență clinică semnificativă a MSI-H. Mai mult decât atât, în ceea ce privește cohorta online, am observat în cazul cancerului colorectal metastatic că TMB este asociată cu un prognostic mai bun, atunci când pacienții au urmat imunoterapie, deși în cazul tumorilor colorectale primare, analiza supraviețuirii a avut doar o tendință către semnificație statistică, luând în considerare împărțirea pe baza TMB, trendul menținându-se la fel ca și în cazul probelor primare. De asemenea am observat că pacienții cu cancer colorectal metastatic și încărcătură mutațională tumorală mare au avut o vârstă mai înaintată, o frecvență mai mare a metastazării ganglionare și o frecvență mai mică a metastazării hepatice, acest lucru arătând diferențe în plus secundar profilului biologic influențat de instabilitatea genomică.

Concluzii. În acest studiu am observat că imunoterapia poate fi o opțiune utilă în tratamentul cancerului colorectal metastatic în unitatea noastră. Având în vedere frecvența crescută a acestei neoplazii și procentul relativ ridicat al instabilității microsatelitare comparativ cu alte patologii oncologice, determinarea statusului MSI și tratamentul individualizat, chimioterapic sau imunoterapic, poate duce la îmbunătățirea rezultatelor și ameliorarea evoluției în cazul acestor pacienți.

Studiu 3. Incidența MSI-H în cancerule digestive și ginecologice. Corelații anatomo-clinice.

Introducere și ipoteza de lucru. Deși instabilitatea microsatelitară este

bine studiată în cancerul de colon și tendința de a utiliza acest profil molecular în subclasificarea acestui tip de cancer și tratarea diferențiată a sa este de mult timp prezentă, în alte tipuri de cancer din sfera digestivă și ginecologică există puține studii care iau în considerare acest aspect cu mare potențial. Prin urmare, o direcție valbroasă de cercetare pentru viitor este reprezentată de determinarea instabilității microsatelitare și în alte tipuri de cancer și subclasificarea lor, acolo unde este cazul, în funcție de acest status. În consecință, studiul de față a avut ca scop determinarea statusului MSI în cele mai frecvente malignități chirurgicale, digestive și ginecologice, analizarea caracteristicilor clinico-patologice în funcție de prezența sau absența instabilității microsatelitare, în încercarea de a stabili corelații semnificative pentru o mai bună stratificare a pacienților oncologici în vederea unei terapii individualizate.

Material și metodă. Au fost înrolați în studiu 64 de pacienți cu cancer digestiv și ginecologic ce au fost selectați prospectiv din Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia, secția Chirurgie și secția Ginecologie. Dintre aceștia 37 au prezentat tumori digestive (colo-rectal, stomac și pancreas) și alți 27 tumori din sfera ginecologică (ovar, sân, endometru, col și vulvă). Toți pacienții au avut o intervenție chirurgicală, cu viză radicală sau paliativă, în funcție de stadializarea tumorală. Intervențiile chirurgicale au fost efectuate de către același medic chirurg, respectiv ginecolog, pentru cele două categorii de malignități studiate. După obținerea consimțământului informat, pentru fiecare pacient s-au recoltat ser și țesut tumoral, acesta din urmă provenit fie din piesa de rezecție, fie biopsic, în cazul tumorilor inextirpabile.

Testarea statusului de instabilitate microsatelitară a fost făcută pentru toate probele prin trimiterea blocului de parafină și a unei probe de ser la laboratorul de genetică și de patologie moleculară pentru analiza RT-PCR. Determinarea statusului MSI s-a realizat prin extracția ADN-ului din blocurile de parafină pentru fiecare subiect, amplificarea PCR și analiză. Datele au fost colectate într-o bază de date în vederea analizării și prelucrării statistice și au fost analizate separat, pe fiecare patologie studiată. Pentru a observa existența unei legături statistice între valori calitative bivariate sau multivariate, am utilizat testul Pearson-Chi Squared, respectiv Testul Fisher. În vederea comparării valorilor medii am folosit testul T pentru eșantioane independente. Datele au fost culese cu ajutorul programului Microsoft Excel 2019, ulterior fiind interpretate cu IBM SPSS v26.0.

Adițional, au fost consemnați următorii parametri referitori la fiecare pacient înrolat: vârsta, sex, localizare primară a tumorii, determinări secundare, histologie, stadializare, prezența anemiei și a hipoproteinemiei, intervenția chirurgicală efectuată, evoluția postoperatorie, complicații, supraviețuire.

Rezultate și discuții. Rezultatele studiului au arătat o incidență crescută a statusului MSI-H în tumorile colo-rectale și gastrice, spre deosebire de tumorile pancreatice și cele din sfera ginecologică, unde incidența MSI-H a fost absentă. În cazul cancerelor colo-rectale s-a remarcat o localizare predominantă la nivelul colonului drept și o tendință către o agresivitate tumorală mai mare comparativ cu tumorile MSS.

Concluzii. La nivelul Spitalului Județean de Urgență Alba Iulia, incidența crescută a cancerelor colo-rectale și gastrice este asociată și cu o incidentă crescută a statusului MSI-H în aceste cazuri.

Localizarea tumorală la nivelul colonului drept și caracterul histologic slab diferențiat este asociat frecvent cu instabilitatea microsatelitară de tip înalt, recomandând testarea MSI cel puțin a acestor pacienți.

În cazul tumorilor pancreatice, datorită incidenței reduse a cazurilor operabile în unitatea noastră, nu s-au putut emite concluzii referitoare la instabilitatea microsatelitară în această patologie.

Patologia malignă ginecologică, deși frecventă în Spitalul Județean de Urgență Alba Iulia, nu a evidențiat caractere de instabilitate microsatelitară în nici unul dintre cazurile incluse în studiu. În aceste condiții, testarea MSI ar trebui rezervată doar cazurilor agresive, cu evoluție nefavorabilă la terapia conventională, fără a constitui o indicație de rutină la toți pacienții cu neoplazii ginecologice.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.

Teza “Incidența instabilității microsatelitare de tip înalt sau deficienței sistemului de reparare al ADN în cancerele digestive și ginecologice” este originală prin tratarea unui subiect de actualitate și importanță în oncologia digestivă și ginecologică.

Contribuțiile inovative ale tezei sunt urmări ale celor 3 studii:

- evidențiază modificările genetice comune în cazul cancerelor digestive ce prezintă instabilitate genomică și determină procesele biologice în care acestea sunt implicate
- determină instabilitatea microsatelitară la nivel local, în cazul unui grup de pacienți oncologici, cu cancer ce exprimă MSI-H, și apoi evaluează eficacitatea imunoterapiei pe baza unei cohorte publice disponibile
- evaluează incidența cancerelor digestive și ginecologice care exprimă instabilitate microsatelitară înaltă sau deficiență în repararea ADN și stabilește unele corelații anatomo-clinice în cazul acestor tumori.

Originalitatea tezei constă în studierea acestor modificari moleculare implicate în oncogeneză în cele mai frecvente cancer chirurgicale, digestive și ginecologice, cu implicațiile terapeutice consecutive lor, precum și în sublinierea abordării multidisciplinare a patologiei chirurgicale maligne.

PHD THESIS ABSTRACT

The incidence of high
microsatellite instability or
deficiency of the DNA
mismatch repair system in
digestive and gynecological
cancers

PhD Student **Flaviu Pițu**

PhD Scientific Coordinator **Prof.dr. Nadim Al Hajjar**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABEL OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Microsatellite instability	19
1.1. Microsatellites and MSI	19
1.2. DNA mismatch repair system	21
1.3. Tumoral mutational burden	23
1.3.1. Concordance MSI-dMMR	24
1.3.2. Relationship between MSI and TMB	25
1.4. Methods for detecting of microsatellite instability	26
1.4.1. Immunohistochemistry	26
1.4.2. Polymerase Chain Reaction and Capillary electrophoresis	27
1.4.3. Next-generation sequencing	28
1.4.4. Single-molecule molecular inversion probes	29
2. Therapeutic options in MSI-H/dMMR tumors	31
2.1. General dates	31
2.2. Immune checkpoint inhibitors	31
2.2.1. CTLA 4	33
2.2.2. PD-1 and PD-L1	34
2.3. Combination therapy and future directions	36
3. Clinical application of MSI	39
3.1. Introduction	39
3.2. Digestive tumors	39
3.2.1. Colo-rectal cancer	39
3.2.1.1. Lynch syndrome	43
3.2.2. Gastric cancer	44
3.2.3. Pancreatic cancer	47
3.2.4. Hepato-biliary cancer	49
3.2.5. Esofagian cancer	50
3.3. Gynecological tumors	51
3.3.1. Endometrial cancer	53
3.3.2. Breast cancer	54
3.3.3. Ovarian cancer	54
3.3.4. Cervical cancer	55
3.4. Conclusions	
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	59
2. General methodology	60
3. Study 1 - The importance of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in determining DNA damage response in digestive cancers	61
3.1. Introduction	61

3.2. Material and method	62
3.3. Results and discussions	62
3.4. Conclusions	67
4. Study 2 - A screening for the candidate diseases that could benefit from immunotherapy	69
4.1. Introduction	69
4.2. Material and method	69
4.3. Results	70
4.4. Discussions	74
4.5. Conclusions	75
5. Study 3 - The incidence of MSI-H in digestive and gynecological cancers. Anatomoclinical correlations.	77
5.1. Introduction	77
5.2. Material and method	78
5.3. Results	79
5.3.1. Digestive tumors	79
5.3.1.1. Colo-rectal cancer	79
5.3.1.2. Gastric cancer	89
5.3.1.3. Pancreatic cancer	93
5.3.1.4. MSI status in digestive cancers	93
5.3.2. Gynecological tumors	93
5.3.2.1. Ovarian cancer	93
5.3.2.2. Breast cancer	94
5.3.2.3. Endometrial cancer	94
5.3.2.4. Cervical and vulvar cancer	94
5.3.2.5. MSI status in gynecological cancers	94
5.4. Discussions	95
5.5. Conclusions	97
6. Final discussions	99
7. Final conclusions	101
8. Originality of research and innovative contribution	103
REFERENCES	105

Key words: genomic instability, MSI-H, immunotherapy, digestive cancers, gynecological cancers

Introduction. General objectives.

Digestive and gynecological oncological pathology is one of the most important public health problems globally, due to its increased incidence and mortality. Although surgical therapy is the only option with curative intent in these malignancies, in many cases, due to diagnosis at an advanced stage, this treatment, at least for the first time, is not possible. In order to obtain the best possible antitumor effect, sometimes even to convert to resectability an initially inoperable case, counteracting mechanisms and exploiting biomarkers involved in oncogenesis, chemotherapy has experienced a constant development, with an ever-increasing effectiveness. However, in some cases, the results are unsatisfactory, with chemotherapy having a minimal influence on the natural course of the disease.

In an attempt to increase the effectiveness of therapy in various types of cancer, a number of biomarkers have been studied over time, but with limited value of predictability in terms of response and evolution of these patients. In recent years, microsatellite instability in cancer has become a biomarker of clinical relevance in the choice of treatment and prognosis of cancer patients. High microsatellite instability (MSI-H) or deficiency of the DNA repair system (dMMR) are biomarkers intensively studied in malignant pathology, reflecting the existence of a hypermutational status, which determines the initiation of the oncogenesis process.

It has been shown that tumors expressing high microsatellite instability have an increased immunogenicity, characterized by a more expressed tumor and peritumoral inflammatory infiltrate, but also by a better therapeutic response to immunotherapy. In recent years, immunotherapy has been an important concern in oncology, obtaining promising results, sometimes with long-term responses, in the treatment of several cancers, such as melanoma, lung and kidney cancer, but also in the case of tumors with microsatellite instability. Immunotherapy seeks to maintain the homeostasis of the immune system and counteract the tumor-induced suppressive immune response. Although immunotherapy has proven effective in oncology, only a certain group of neoplastic patients respond to this treatment. The determination of biomarkers with predictive value for the response to immunotherapy is a key point in increasing the efficiency of treatment of these patients. An example that highlights the impact of MSI-H in oncology is the approval in 2017 by the US Food and Drug Administration (FDA) of the use of immunotherapy for the treatment of adult and pediatric patients with unresectable or metastatic solid tumors expressing MSI-H / dMMR, regardless of the tissue of origin, tumors that did not respond to the initial conventional treatment. This was a novelty in oncology, being for the first time when some biomarkers independent of the tumor tissue of origin are used in the choice of anticancer therapy. Although numerous studies have been published in colorectal cancer on the incidence and

therapeutic implications of microsatellite instability, there are few data on other malignancies.

Starting from these premises, the present paper aimed to determine the incidence of MSI-H / dMMR in the most common digestive and gynecological surgical malignancies, in the Alba Iulia County Emergency Hospital, but also the clinical-pathological characteristics of tumors with this molecular profile, in order to highlight potential significant correlations with clinical applicability in these pathologies.

In the first part of the paper, a review of relevant information on current knowledge regarding microsatellite instability, therapeutic options and clinical applicability in digestive and gynecological cancers with this molecular profile was performed. The second part of the thesis represents the personal contribution and was structured in three studies.

Personal contribution

In order to achieve the proposed objectives, several methodological steps were considered.

The theoretical documentation was made by electronic search of the most important publications in the field until January 2021, using the PubMed platform.

To study common genetic changes in digestive cancers with genomic instability and to determine the biological processes in which they are involved, patients were selected from the MSK Impact Cohort. The online data was downloaded via cBioPortal. Colorectal adenocarcinoma, gastroesophageal adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, cholangiocarcinoma, neoplasms with MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2 mutations were included in the study.

The next study was a cross-sectional, observational and analytical one. This study included patients with various digestive or gynecological malignancies who underwent surgery at the Alba Iulia County Emergency Hospital between August 2018 and September 2020. The determination of MSI status was performed by RT-PCR. Data on tumor mutational load and the effects of immunotherapy were downloaded using the cBioPortal interface. The value was evaluated as a screening method for cancer patients who could benefit from the effects of immunotherapy.

In the last study, 64 patients with digestive and gynecological cancers were enrolled, prospectively selected from the Alba Iulia County Emergency Hospital, the Surgery Department and the Gynecology Department, who underwent a radical or palliative surgery. Of these, 37 presented digestive tumors and another 27 tumors from the gynecological sphere. The testing of the microsatellite instability status was done for all samples by sending the paraffin block and a serum sample to the genetics and molecular pathology laboratory Resident Laboratory Oradea for RT-PCR analysis. Additionally, the following parameters were recorded for each patient enrolled: age,

sex, primary location of the tumor, secondary determinations, histology, staging, the presence of anemia and hypoproteinemia, surgery, postoperative evolution, complications, survival. The data were collected in a database and statistically processed.

Study 1. The importance of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in determining DNA damage response in digestive cancers

Introduction and work hypothesis. Genomic instability is a common feature across human cancers, but presents variation across different types of cancer, patients and cells of from the same tumor. This can be caused either by changes in the DNA damage repair pathways, aberrant histone modifications or methylation. One clinically applied method for determining the grade of genomic instability is through assessing the grade of microsatellite instability, which was first applied to colon cancer. Due to the current indications for identifying the status of MSI in colon cancers, as well as the increased frequency of digestive cancers, we decided to extend the spectrum of genomic instability to other cancers in the field of digestive oncology. The aim of this study was to determine the common mutated genes between digestive cancers that present genomic instability and to determine the biological processes in which these are implicated

Material and method. The patients included in the present study were selected from the MSK Impact cohort. The online data was downloaded via cBioPortal. We included the following cancer types: colon adenocarcinoma, colorectal adenocarcinoma, rectal adenocarcinoma, stomach adenocarcinoma, esophagogastric adenocarcinoma, esophageal adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, cholangiocarcinoma that also presented mutations in MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2. Data analysis was performed using R 3.5.3 and PANTHER. We included only the GO SLIM processes that had a false discovery rate (FDR) under 0.05. Chord diagrams were generated using the circlize R package.

Results. Taking the genes mutated in the primary site and compare them across cancers considering the number of genes implicated in that process, we assessed that the majority of processes are shared between colo-rectal adenocarcinoma and gastro-esofagian adenocarcinoma, showing either common processes, probably because of similar deregulated processes or because of overrepresentation of these cancer types in the cohort and the presence of a higher number of possible mutated genes. Analyzing the genes mutated in the primary site and compare them across cancers considering the fold change of the genes implicated in that process, the common process among colo-rectal adenocarcinoma, gastro-esofagian adenocarcinoma

and cholangiocarcinoma with the highest fold change enrichment was the DNA mismatch repair. Taking the genes mutated in the metastatic site and compare them across cancers considering the number of genes implicated in that process, between col-rectal adenocarcinoma and gastro-esofagian adenocarcinoma, there were four processes that overlapped: cellular process, biological regulation, cellular response to stimulus, macromolecule metabolic process. Taking the genes mutated in the metastatic site and compare them across cancers considering the fold change of the genes implicated in that process, there were two processes shared across cholangiocarcinoma and col-rectal adenocarcinoma, represented by mitotic G2 DNA damage checkpoint and DNA damage checkpoint. There was one process shared across col-rectal adenocarcinoma and gastro-esofagian adenocarcinoma nucleotide-excision repair, DNA incision.

Conclusions. Most processes shared when taking into consideration the number of genes implicated in the process were general cellular processes, while, when taking into account the fold change, most shared and important processes were represented by DNA damage repair pathways, showing the importance of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 mutations rather than the type of cancer in altering DNA damage repair pathways.

Study 2. A screening for the candidate diseases that could benefit from immunotherapy

Introduction and work hypothesis. The aim of the current study was to determine the microsatellite instability on a local cohort and, on the diseases that present MSI-high, to further evaluate the efficacy of these drugs on a publicly available cohort.

Material and method. In the present study we included patients with digestive or gynecological malignancies, who were admitted at the Alba Iulia County Emergency Hospital in the time period august 2018-september 2020. MSI testing was performed by Resident Laboratory Oradea. A number of 5 microsatellites were used (BAT-25, BAT-26, NR21, NR-24, MONO-27), and the tests were performed from both tumoral tissue and normal control tissue. If none of the five markers showed instability, the tumor was referred to as MS-stable (MSS); if only one marker showed instability, then the tumor was defined as MSI-low (MSI-L); and if instability was revealed in two or more markers, the tumor was defined as MSI-high (MSI-H). TMB and Immunotherapy (MSKCC Nat Genet 2019) data was downloaded using the cBioPortal interface. Data analysis was performed using R 4.0.1. Categorical variables were represented as absolute value (percent). Contingency tables were analyzed using Fisher's test. Considering the low number of patients in the final groups, we decided to

use nonparametric statistics. Continuous variables were represented as median (quartile 1, quartile 3). Differences between two non-normally distributed groups were performed using Mann-Whitney Wilcoxon rank sum test. Kaplan Meyer curves were used to represent survival. Log-rank test was used to assess survival. A p-value under 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussions. In the current study we observed that the most relevant cases for which we could implement immunotherapy in the treatment of MSI high patients are represented by the colon cancer cases. This is supported by the fact that colon cancer patients represent the highest percentage of malignancies treated in our unit, which have a clinically relevant prevalence of MSI high. More than this, on the online cohort we observed in the case of metastatic colon cancer that high TMB is associated with a better prognosis when treated with immunotherapy, whereas, in the case of primary colon cancer samples, the survival analysis only had a tendency for statistical significance considering the TMB dichotomization, with the trend being maintained as in the case of primary samples. We also observed that metastatic colon cancer patients with high TMB had a higher age, a higher frequency of lymph node metastases and a lower frequency of liver metastases, this showing additional differences secondary to the biology that is influenced by genomic instability.

Conclusions. In the current study we observed that immunotherapy might be a useful tool in the treatment of metastatic colon cancer in our unit. Considering the frequency of this malignancy and the relative high proportion of the microsatellite instability, the assessment of MSI status and the personalized management, chemotherapy or immunotherapy could lead to better results and outcome for these patients.

Study 3. The incidence of MSI-H in digestive and gynecological cancers. Anatomico-clinical correlations.

Introduction and work hypothesis. Although the microsatellite instability is well studied in colon cancer and the current practice to use this molecular profile in stratifying and individual managing of this type of cancer is recommended by medical guidelines, in other types of digestive or gynecological malignancies there are few studies that consider this aspect. Thus, the determination of the microsatellite instability in other types of cancers and the subclassification of them based on this status, seems to become a valuable research direction for the future. Consequently, the aim of this study was to determine the MSI status of the most frequently surgical malignancies, in digestive and gynecological field, to analyze the clinico-pathological parameters based on the presence or absence of the microsatellite instability, trying to

find significant correlations that can lead to a better stratification and personalized therapy for these oncological patients.

Material and method. In the current study we included prospective 64 patients with digestive or gynecological malignancies, who were admitted at the Surgery and Gynecological Department of Alba Iulia County Emergency Hospital. 37 of them presented digestive malignancies (col-rectal, gastric and pancreas), 27 patients had gynecological malignancies (ovar, breast, endometrium, cervix and vulva). All patients had a radical or paliative surgical intervention based on tumor staging. The interventions were performed by the same surgeon, respectively gynecologist depending on the type of the cancer. After the informed consent, for each patient were taken blood samples and tumoral tissue from resection specimen or biopsy in cases of unresectability. MSI testing was performed from tumor and blood collected samples at genetic and molecular pathology *Rezident Laboratory Oradea* using the RT-PCR method of assessment. The procedure of MSI status determination included the DNA extraction from paraffin blocks from each subject, PCR amplification and analyze. Data were collected in a data base in order to analyse and statistical processing for each pathology. To assess a statistical correlation between bivariate or multivariate calitative values, we used the Pearson-Chi Squared test, respectively Fisher test. With the purpose of medium values comparison the T test for independent samples was used. Data were collected with Microsoft Excel 2019 and analysed with IBM SPSS v26.0. Additional, for each patient were recorded: age, sex, primar site of the tumor, secondary determination, histology, staging, anemia and hipoproteinemia, surgical intervention, postoperative outcome, complications, survival.

Results and discussions. The results of the current study showed a high incidence of MSI-H status in colo-rectal and gastric tumors, in opposition to the pancreatic and gynecological sphere localisation, where the incidence was null. In colo-rectal malignancies with MSI-H status, we noted a predominant localisation on the right side and a more aggressive tendency compared to MSS tumors.

Conclusions. The high incidence of colo-rectal and gastric cancer in Alba Iulia County Emergency Hospital was associated with a high prevalence of MSI-H status in these cases. The localisation on the right side of the colon and the poorly differentiated histology of the tumors are frequently associated with high microsatellite instability, recommending the MSI testing at least for these patients. Regarding the pancreatic localization of the tumors, due to the low operability rate in our unit, we cannot issue conclusions on microsatellite instability in this pathology. Although frequent in Alba Iulia County Emergency Hospital, the gynecological malignancy, showed characters of microsatellite instability in none of the analysed cases. Under these circumstances, the MSI testing should be reserved only for the cases with aggressive characters, with unfavorable outcome under conventional therapy, without being a routine indication for all the gynecological malignancies.

Originality of research and innovative contribution

The originality of research of the thesis “The incidence of high microsatellite instability or deficiency of the DNA mismatch repair system in digestive and gynecological cancers” consists in treating a present and important field in surgical and gynecological oncology.

The innovative contributions of the thesis are the result of the 3 studies:

- highlights common genetic changes in digestive cancers that have genomic instability and determines the biological processes in which they are involved
- determine microsatellite instability at the local level, in the case of a group of cancer patients with cancers expressing MSI-H, and then evaluate the effectiveness of immunotherapy based on a publicly available cohort
- evaluates the incidence of digestive and gynecological cancers that express high microsatellite instability or deficiency in DNA repair and establishes some anatomo-clinical correlations in the case of these tumors

The originality of the thesis consists in studying these molecular changes involved in oncogenesis in the most common surgical, digestive and gynecological cancers, with their consequent therapeutic implications, as well as in emphasizing the multidisciplinary approach to malignant surgical pathology.