

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul II – Morfologie Microscopică**

TĂBAN I. OANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. DEMA ALIS LILIANA CARMEN**

**Timișoara
2021**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul II – Morfologie Microscopică**

TĂBAN I. OANA



TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

**TUMORILE NEUROENDOCRINE ALE
TRACTULUI DIGESTIV: STUDIUL FACTORILOR
MORFOLOGICI ȘI IMUNOHISTOCHIMICI
IMPLICAȚI ÎN PROGNOSTICUL ȘI TERAPIA
PACIENȚILOR**

**Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. DEMA ALIS LILIANA CARMEN**

**Timișoara
2021**

CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate.....	VI
Lista abrevierilor.....	VII
Lista figurilor.....	IX
Lista graficelor.....	XIII
Lista tabelelor.....	XIV
Mulțumiri	XV
INTRODUCERE	XVI
PARTEA GENERALĂ.....	1
1. Sistemul neuroendocrin gastro-intestinal.....	1
1.1. Aspecte histologice generale.....	1
1.2. Particularități histologice ale sistemului neuroendocrin în funcție de segmentele tractului gastro-intestinal	3
2. Neoplasmele neuroendocrine ale tractului gastro-intestinal: aspecte epidemiologice, genetice și clinice	5
3. Clasificarea, gradarea și stadializarea neoplasmelor neuroendocrine gastro- intestinale. Aspectele morfologice și imunohistochimice	9
3.1. Clasificarea și gradarea neoplasmelor neuroendocrine gastro-intestinale	9
3.2. Stadializarea neoplasmelor neuroendocrine gastro-intestinale	11
3.3. Neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale: aspecte morfologice și imunohistochimice	15
3.3.1. Aspecte macroscopice.....	15
3.3.2. Aspecte microscopice generale	15
3.3.3. Aspecte imunohistochimice	16
3.3.4. Neoplasmele neuroendocrine gastrice: aspecte microscopice.....	17
3.3.5. Neoplasmele neuroendocrine ale intestinului subțire: aspecte microscopice	18
3.3.6. Neoplasmele neuroendocrine apendiculare: aspecte microscopice	19
3.3.7. Neoplasmele neuroendocrine colo-rectale: aspecte microscopice.....	20
4. Considerații generale privind diagnosticul clinic, biochimic și tratamentul oncologic al pacienților cu neoplasme neuroendocrine gastro-intestinale.....	22
4.1. Simptomatologia specifică localizării tumorii primare	22
4.2. Sindromul carcinoid și criza carcinoidă.....	22
4.3. Markerii biochimici în NNE	23
4.4. Principii de tratament oncologic în NNE.....	24
4.4.1. Managementul chirurgical	24
4.4.2. Managementul progresiei tumorale	26
PARTEA SPECIALĂ	28
5. Obiectivele studiului	28
6. Materialul de studiu și metodele de lucru	29
6.1. Prezentarea cazuisticii	29
6.2. Metode histologice	29
6.3. Metode ihc	30
6.4. Interpretarea reacțiilor IHC.....	32

6.5. Analiza statistică	33
7. Rezultatele cercetării	34
7.1. Încadrarea și clasificarea histopatologică a neoplasmelor neuroendocrine studiate.....	34
7.2. Aspectele clinico-morfologice ale neoplasmelor neuroendocrine studiate.....	38
7.2.1. Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G1	38
7.2.2. Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G2	41
7.2.3. Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G3	42
7.2.4. Carcinoamele neuroendocrine	44
7.2.5. Neoplasmele mixte neuroendocrine-nonneuroendocrine.....	46
7.2.6. Adenocarcinoamele cu celule caliciforme	47
7.2.7. Stadializarea postoperatorie/postpolipectomie a neoplasmelor neuroendocrine gastro-intestinale.....	47
7.2.8. Corelația dintre IP Ki-67 și factorii clinico-morfologici implicați în stadializarea neoplasmelor neuroendocrine gastro-intestinale	49
7.3. Expresia IHC a SSTR2 și SSTR5 în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	64
7.4. Expresia IHC a chemokinei CXCR4 în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	72
7.5. Evaluarea IHC a proteinei supresoare tumorale PTEN în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	77
7.6. Expresia IHC a activării căii de semnalizare mTOR în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	82
7.7. Expresia IHC a activării proteinei pAkt în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale	87
8. Discuții	91
8.1. Considerații privind incidența, clasificarea, aspectele histopatologice și IHC ale neoplasmelor neuroendocrine gastro-intestinale.....	91
8.2. Considerații asupra expresiei IHC a SSTR2 și SSTR5 în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	97
8.3. Considerații privind expresia IHC a chemokinei CXCR4 în neoplasmele neuroendocrine ale tractului gastro-intestinal	100
8.4. Semnificația expresiei IHC a genei supresoare tumorale PTEN în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	102
8.5. Calea de semnalizare PI3K/Akt/mTOR în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale.....	105
8.5.1. Principalele componente ale căii de semnalizare PI3K/Akt/mTOR	105
8.5.2. Mecanismele de control și reglare ale sistemelor de semnalizare în cadrul carcinogenezei	106
8.5.3. Expresia Akt în neoplasmele neuroendocrine gastro-entero-pancreatice	107
8.5.4. Expresia mTOR în neoplasmele neuroendocrine gastro-intestinale	108
8.5.5. Terapii țintite PI3K/Akt/mTOR	109
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	113
BIBLIOGRAFIE.....	119
Anexe	I

INTRODUCERE

Neoplaziile neuroendocrine (NNE) constituie proliferări tumorale epiteliale heterogene, complexe, care includ entități criptice, unele cu posibilități terapeutice limitate, marcate de evoluții imprevizibile și în rare cazuri, cu remisiuni complete după tratament.

Tumorile tractului digestiv constituie majoritatea tumorilor neuroendocrine (55%), urmate ca frecvență de tumorile neuroendocrine bronhopulmonare (25%) [1]. Conform datelor SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), din anul 1973 până în prezent s-a remarcat creșterea evidentă a incidenței tumorilor neuroendocrine digestive, atribuită în principal îmbunătățirii metodelor de diagnostic endoscopic și imagistic [2]. Această afirmație este susținută de creșterea semnificativă a incidenței tumorilor localizate. Datele SEER arată că în decada 2000-2009, tumorile neuroendocrine ale tractului digestiv au constituit 0,52% din cazurile nou diagnosticate de cancer, incidența medie fiind de 2,5 cazuri/100.000 indivizi/an [3].

În trecut, NNE erau clasificate în funcție de localizare, deși existau numeroase similitudini între sistemele de clasificare. Această abordare a creat confuzie în rândul patologilor. Un eveniment important care a condus la formularea noii clasificări a tumorilor neuroendocrine a fost întrunirea unui grup de patologi din cadrul Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS), American Joint Committee on Cancer (AJCC) și College of American Pathologists (CAP). În cadrul acestei conferințe s-a hotărât ca termenul de *carcinoid*, atât de frecvent folosit în trecut, să fie evitat în diagnosticul tumorilor neuroendocrine primare [4,5]. Sistemul de clasificare și gradare al NNE din anul 2019 are ca fundament, clasificarea OMS a NNE pancreatice din anul 2017, clasificare care face distincție clară între tumorile neuroendocrine bine diferențiate și carcinoamele neuroendocrine (CNE) și introduce o nouă categorie de tumori, tumorile neuroendocrine bine diferențiate de grad înalt G3 [4]. Informațiile oferite de studii foarte recente au condus la conturarea unor domenii de cercetare de interes major, referitoare la mecanismele patogenetice, corelațiile clinico-patologice și identificarea unor noi markeri prognostici și terapeutici în neoplazmele neuroendocrine.

PARTEA GENERALĂ

Celulele enteroendocrine sau neuroendocrine (NE) sau celulele APUD iau naștere din celulele stem multipotente și formează cel mai mare și cel mai complex organ endocrin al corpului uman, care secretă o mare varietate de hormoni, de ex. gastrina (celulele G), grelina (celulele P sau X), somatostatina (celulele D), colecistokina (celulele I), serotonina (celulele enterocromafine), peptidul insulinotrop glucoză-dependent (celulele K), peptidul glucagon-like și peptidul YY (celulele L). Producții de secreție se acumulează în granule secretorii și sunt eliberați prin exocitoză la nivelul membranei bazolaterale în spațiul interstițial și apoi în circulația sanguină [6,7,8].

Dinspre duoden înspre rect, densitatea celulelor NE este mai mare proximal, scăzând semnificativ la nivelul colonului, ca apoi să crească din nou în mucoasa

rectală. Aminele/peptidele conținute în veziculele secretorii din celulele NE stau la baza clasificării acestora în trei tipuri celulare: celulele EC, predominante la nivelul tractului gastro-intestinal, care secretă serotonina sau 5-hidroxitriptamina; celulele D (celulele delta), întâlnite în întregul tract gastro-intestinal și identificate imunohistochimic prin reactivitatea pentru somatostatina; celulele L prezente de la nivelul duodenului până în rect, însă rare proximal de ileonul terminal [6,9].

NNE se dezvoltă în diferite organe și țesuturi epiteliale și includ o mare varietate de tumori, diferite din punct de vedere etiologic, clinic, morfologic, molecular și prognostic. Sistemul de clasificare și gradare a NNE gastro-intestinale din anul 2019 introduce o nouă categorie de tumori, tumorile neuroendocrine bine diferențiate de grad înalt (G3). Gradul de diferențiere al tumorilor neuroendocrine (G1, G2 sau G3) se stabilește în funcție de activitatea proliferativă calculată prin evaluarea ratei mitotice și a indicelui de proliferare Ki-67 (IP Ki-67). Rata mitotică se exprimă ca număr de mitoze/2 mm² și se calculează prin numărarea figurilor mitotice pe 50 de câmpuri microscopice de 0,2 mm². IP Ki-67 se determină prin numărarea celulelor tumorale cu marcaj nuclear raportate la cel puțin 500 de celule tumorale, în zonele cu cele mai multe celule pozitive ("hotspots") identificate la obiectiv mare. În situația în care cele două criterii de apreciere a activității proliferative indică grade diferite de malignitate, se recomandă selectarea criteriului care conferă cel mai mare grad. Pentru a evita confuzia cu tumorile neuroendocrine bine diferențiate G3, noua clasificare OMS precizează că nu se va atribui gradul de diferențiere carcinoamelor neuroendocrine (CNE), acestea fiind de grad înalt prin definiție [4].

Sistemele de stadializare TNM sunt diferite pentru tumorile neuroendocrine și CNE gastro-intestinale. CNE, considerate de grad înalt, se clasifică conform criteriilor de stadializare ale carcinoamelor tractului gastro-intestinal [4,10].

Microscopic, tumorile neuroendocrine bine diferențiate prezintă un pattern organoid și sunt constituite din celule cu citoplasmă eozinofilă, granulară și nuclei rotunzi sau ovali, uniformi, cromatina dispersată în "sare și piper", nucleoli mici. Se clasifică în tumori neuroendocrine bine diferențiate de grad scăzut (G1), de grad intermediar (G2) și de grad înalt (G3). CNE (cu celule mici sau mari) se caracterizează prin rată de proliferare înaltă, demonstrată de rata mitotică > 20/2 mm² și/sau IP Ki-67 > 20%. Termenul de MiNEN definește o tumoră mixtă endocrină-nonneuroendocrină, în care fiecare componentă tumorală deține ≥ 30% din populația tumorală. În MiNEN-urile tubului digestiv, ambele componente tumorale sunt de cele mai multe ori carcinoame, cazuri pentru care termenul de MANEC poate fi utilizat [4,11]. Adenocarcinomul cu celule caliciforme (ACC) sau adenocarcinomul ex-carcinoid cu celule caliciforme (carcinoidul cu celule caliciforme, după vechea denumire) este o tumoră amfocrină, întâlnită aproape întotdeauna la nivelul apendicelui, constituită din celule mucosecretante de tipul celulelor caliciforme și o populație variabilă de celule NE și celule Paneth-like.

Conform ghidurilor actuale, diferențierea NE a celulelor tumorale trebuie demonstrată imunohistochimic cu markerii cromogranina A (CgA) și sinaptofizină (Syn). În prezent este intens discutată evaluarea receptorilor de somatostatina (SSTR) anterior administrării oricărui tratament [8,11].

Simptomatologia pacienților cu NNE gastro-intestinale se datorează invaziei tumorale, dezvoltării metastazelor sau secreției hormonale de către celulele tumorale. Sindromul carcinoid apare la circa 30-40% dintre pacienți și se caracterizează printr-o constelație de simptome, precum episoade de roșeață la nivelul feței, diaree sau bronhospasm. Fibroza și deficitul nutrițional sunt complicații tardive. Cei mai utilizați markeri biochimici în diagnosticul tumorilor neuroendocrine gastro-intestinale sunt acidul 5-hidroxiindolacetic (5-HIAA) și CgA [12].

Deși există numeroase controverse legate de conduita terapeutică a tumorilor neuroendocrine cu dimensiuni cuprinse între 1 și 2 cm, pacienții cu tumori gastrice, duodenale și colo-rectale ≤ 2 cm au indicație de rezecție endoscopică mucosală sau submucosală și supraveghere [12]. În cazul tumorilor neuroendocrine de intestin subțire, intervenția chirurgicală are ca scop rezecția completă a tumorii primare și a adenopatiei mezenterice, precum și stadializarea prin evaluarea intraoperatorie a peritoneului, ficatului și ovarelor [13]. Ghidurile NCCN recomandă apendicectomia pentru tumorile apendiculare sub 2 cm și hemicolectomia dreaptă pentru tumorile peste 2 cm [14,15]. Colectomia cu limfadenectomie regională este recomandată pentru tumorile neuroendocrine colonice [12]. Managementul progresiei tumorale este realizat cu analogi de somatostatină [16,17], terapii țintă cu Everolimus [17], Bevacizumab [12] sau Sunitinib [18,19], chimioterapie citotoxică cu agenți alchilanti și antraciline sau cu radionuclizi ai receptorilor peptidici [20,21]. Imunoterapia este ultima opțiune terapeutică a pacienților cu tumori neuroendocrine avansate [12].

PARTEA SPECIALĂ

1. OBIECTIVELE STUDIULUI ȘI METODE DE LUCRU

Având în vedere numeroasele modificări care au survenit în ultimii ani, în clasificarea și încadrarea NNE gastro-intestinale, din cazuistica Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara am selectat toate cazurile de tumori neuroendocrine sau tumori cu diferențiere neuroendocrină ale tractului digestiv extrapancreatic, diagnosticate în perioada 2008-2018. În prima etapă a studiului ne-am propus încadrarea acestor tumori conform clasificării OMS din anul 2019 [4]. Cazuistica noastră a inclus 71 de cazuri, dintre care 52 de tumori primare gastrice, ale intestinului subțire, apendiculare și colonice și 19 metastaze hepatice ale unor neoplasme neuroendocrine. Cazurile au fost supuse investigațiilor imunohistochimice pentru CgA, Syn, proteina p53 și Ki-67, în vederea încadrării și stratificării cât mai corectă a leziunilor tumorale. În a doua parte a studiului nostru, am decis să analizăm profilul molecular al NNE prin metode imunohistochimice, cu scopul de a identifica noi markeri cu impact prognostic și care pot constitui posibile ținte terapeutice. În lucrarea doctorală am urmărit corelațiile dintre rezultatele imunoreacțiilor cu anticorpii anti-receptori de somatostatină 2 și 5, anti-PTEN, anti-CXCR4, anti-AKT și anti-mTOR și cei mai importanți factori clinicomorfologici ai pacienților cu NNE gastro-intestinale. Până în prezent, în literatura de specialitate există doar câteva studii care au cercetat tumorile neuroendocrine bine diferențiate G3. Aceste tumori descrise recent, a căror incidență este cel mai probabil

subestimată, sunt dificil de diagnosticat morfologic și până în prezent, nu au fost publicate scheme standardizate de tratament. Din acest motiv ne-am propus să prezentăm cele mai inovatoare metode de diagnostic și noi opțiuni terapeutice care, din cunoștințele noastre, nu sunt implementate în țara noastră.

Pentru analiza statistică am utilizat testul Hi pătrat (χ^2) cu corecția Yates pentru continuitate, iar pentru variabilele non-numerice s-a utilizat testul Fisher exact.

2. REZULTATELE CERCETĂRII

Pacienții (37 bărbați – 52,1% și 34 femei – 47,9%) au prezentat vârste cuprinse între 19 ani și 88 ani, cu o vârstă medie de 59,9 ani. În cazuistica noastră, tumorile neuroendocrine au fost mai frecvent întâlnite la femei sub 50 de ani. Cele mai frecvente cazuri au fost metastazele hepatice (26,7%), urmate de tumorile primare ale colonului stâng și rectului (18,3%). Deși am remarcat creșterea semnificativă a numărului de cazuri în ultimii 3 ani de studiu, metastazele hepatice ale tumorilor neuroendocrine au prezentat o distribuție uniformă de-a lungul anilor.

Activitatea proliferativă a arătat valori foarte diferite, care demonstrează creșterea direct proporțională a acestora în raport cu gradul de malignitate (tip tumoral-IP Ki-67: tumori neuroendocrine G1-1,2%; tumori neuroendocrine G2-10,5%; tumori neuroendocrine G3-35,7%; CNE-56,2%).

Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G1 au reprezentat 38% din cazuistica noastră, întâlnite mult mai frecvent la femei tinere și la nivelul intestinului subțire (29,1%). În 6 cazuri (22,2%) am diagnosticat metastaze hepatice ale unor tumori neuroendocrine cu IP Ki-67 mediu de 1,01%. IP Ki-67 mediu a fost de 1,2%, cu diferențe nesemnificative statistic în funcție de localizare. Din acest grup, tumorile gastrice au prezentat cea mai intensă activitate proliferativă (IP Ki-67 mediu=1,8%). În cazuistica noastră am identificat 18 **tumori neuroendocrine bine diferențiate G2** (25,4% din cazuri), întâlnite predominant după vârsta de 50 ani, atât la bărbați, cât și la femei. Tumorile neuroendocrine G2 s-au localizat mai frecvent la nivelul stomacului (22,2%) și colonului drept (16,7%), însă cele mai numeroase cazuri au fost diagnosticate ca metastaze hepatice (33,3%). Reacțiile imunohistochimice pentru markerii NE au evidențiat pozitivarea difuză sau focală citoplasmatică pentru CgA în 100% din tumorile neuroendocrine G2 gastrice, în timp ce Syn a fost pozitivă în 50% dintre acestea. Tumorile colonului stâng și rectului au prezentat imunoreacții pozitive pentru Syn în toate cazurile. Cel mai scăzut IP Ki-67 mediu a fost observat în tumorile intestinului subțire (3,4%), diferențele dintre IP Ki-67 în funcție de localizare fiind semnificative statistic ($P=0,01$). **Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G3** (7 cazuri - 9,8%) au fost diagnosticate după vârsta de 40 de ani, atât la bărbați, cât și la femei. În funcție de localizare, tumorile neuroendocrine G3 au fost diagnosticate ca metastaze hepatice (4 cazuri), tumori ale colonului drept (2 cazuri) și o tumoră duodenală. Toate metastazele hepatice ale tumorilor neuroendocrine G3 au prezentat imunoreacții pozitive pentru Syn. În unele cazuri, IP Ki-67 a fost mult mai mare decât valoarea medie a IP Ki-67 (35,7%), însă fără diferențe semnificative statistic în funcție de localizare. Imunoreacțiile p53 au fost negative sau focal pozitive, în mai puțin de 25% din populația tumorală. Încadrarea histopatologică, dificilă pe colorația uzuală, implică unele aspecte particulare, precum pierderea focală a patternului organoid,

pleomorfismul nuclear evident, dispunerea celulelor tumorale sub forma unor plaje largi sau trabecule dezorganizate, microfocare de necroză tumorală, stromă conjunctivă mai bogată. **CNE** au fost diagnosticate la 12 pacienți (17%), mai frecvent la bărbați după vârsta de 50 de ani, localizate în 33,3% din cazuri la nivelul colonului stâng și rectului. În lotul nostru, apendicele nu reprezintă originea CNE. Toate metastazele hepatice au fost pozitive pentru Syn. În funcție de localizare, cele mai agresive tumori sunt localizate în colonul stâng și rect (IP Ki-67 mediu=79,8%; $P=0,001$). Cu aceeași localizare au fost identificate 9 cazuri de CNE cu celule mari. În lotul studiat am identificat 3 cazuri de **MINEN**, dintre care două tumori care combină aspectele adenocarcinoamelor de grad scăzut cu tumori neuroendocrine G2 și 4 cazuri de adenocarcinoame cu celule caliciforme (ACC) sau adenocarcinoame ex-carcinoide cu celule caliciforme, cu imunoreacții pozitive pentru CgA și/sau Syn. În ACC, IP Ki-67 a prezentat valori variabile între 1,8% și 35,2%, cu o medie de 20,5%.

Cele mai numeroase NNE au fost diagnosticate în stadii avansate, fiind identificate 27 de cazuri în stadiile pT3 și pT4 (64,3%), în comparație cu 15 cazuri în stadiile pT1 și pT2 (35,7%). Am notat metastaze limfonodulare în 54,8% din cazuri, invazie limfovaculară în 59,5% din cazuri și invazie perineurală în 33,3% din NNE studiate. IP Ki-67 mediu a fost semnificativ mai mare în NNE încadrate pT3 și pT4 ($P=0,01$), însă cu o ușoară creștere de la tumorile pT3 la tumorile pT4. Activitatea proliferativă a fost semnificativ sporită în stadiile clinice avansate III și IV (44 cazuri - 72,1%) față de stadiile I și II (17 cazuri - 27,9%; $P=0,004$). În studiul nostru, invazia perineurală se corelează semnificativ cu IP Ki-67 ($P=0,02$), fiind un factor de prognostic negativ pentru NNE gastro-intestinale.

Din lotul de studiu am obținut reacții imunohistochimice pozitive pentru **SSTR2** (clona UMB1, Abcam) în 46 de cazuri (64,8%), cu pattern membranar complet sau incomplet, predominant intens. În tumorile secundare hepatice am notat 57,9% imunoreacții pozitive, spre deosebire de tumorile primare cu imunoreacții pozitive în 67,3% din cazuri. Există o corelație semnificativă între gradul de diferențiere tumorală și expresia SSTR2 ($P=0,0004$), astfel NNE G1 au prezentat imunoreacții pozitive în 96,4% din cazuri în comparație cu NNE G3, cu doar 22,7% cazuri pozitive. Menționăm pozitivarea imunoreacțiilor pentru SSTR2 în 33,3% din CNE, procent mai mare decât cel notat pentru tumorile neuroendocrine G3. 50% dintre ACC au fost SSTR2 pozitive. Toate cazurile din stadii incipiente de boală neoplazică au fost pozitive pentru SSTR2, procent mult mai mare decât cel întâlnit în cazul tumorilor în stadii avansate III și IV (56,8%), însă fără diferență semnificativă statistic. Rezultatele noastre nu arată o relație între expresia SSTR2 și stadiul pN, dar expresia SSTR2 s-a corelat semnificativ cu invazia perineurală ($P=0,04$). Tumorile care au asociat emboli vasculari au fost SSTR2 pozitive mai frecvent (100%) decât tumorile fără invazie limfovaculară (56%).

Imunoreacțiile cu anticorpus **SSTR5** (clona UMB4, Abcam) s-au pozitivat în citoplasma celulelor tumorale. Am obținut reacții imunohistochimice pozitive în 20 de cazuri (28,2%), mai frecvent în tumorile primare (32,7%) decât în metastaze (15,8%). Am remarcat corelația semnificativă ($P<0,0001$) dintre expresia scăzută pentru SSTR5 și NNE de grad înalt (tumori neuroendocrine bine diferențiate G3 - 14,3%; CNE -

16,7). Rezultatele noastre nu arată corelații semnificative între expresia SSTR5 și invazia limfovasculară, invazia perineurală și stadiul pN.

Sub control extern pozitiv, am obținut imunoreacții pozitive pentru **CXCR4** (clona UMB2, Abcam), cu marcaj citoplasmatic, membranar sau citoplasmatic și membranar al celulelor tumorale. Imunoreactivitatea limfocitelor și a celulelor endoteliale a servit drept control intern. Am remarcat corelația semnificativă statistic între expresia CXCR4 și gradul de diferențiere tumorală; tumorile G1 au prezentat expresie scăzută în 75% din cazuri, în timp ce NNE G3 au avut expresie CXCR4 înaltă în 63,6% din cazuri ($P=0,0002$). Menționăm 7 tumori neuroendocrine G1 și 8 tumori neuroendocrine G2 cu scoruri moderate și înalte pentru CXCR4. Am remarcat asocierea semnificativă dintre scorul de imunoreacție scăzut, stadiile clinice incipiente ($P=0,0002$), absența emboliilor tumorale ($P=0,0002$) și a invaziei perineurale ($P=0,007$).

NNE gastro-intestinale au fost analizate imunohistochimic cu anticorpul monoclonal anti-**PTEN** (clona 6H2.1, Dako). Sub control intern pozitiv reprezentat de celule endoteliale și filete nervoase, am obținut colorarea predominant citoplasmatică a celulelor tumorale. Pierderea expresiei PTEN a fost întâlnită semnificativ mai frecvent în metastazele hepatice (73,7%) decât în tumorile primare (50%; $P=0,003$). Tumorile fără expresie sau cu expresie slabă pentru PTEN au fost localizate mai frecvent în colonul drept ($P=0,03$). Am remarcat corelația semnificativă dintre expresia PTEN absentă/slabă și gradul înalt de malignitate ($P=0,003$). În cazuistica noastră am observat 4 tumori neuroendocrine G1 fără expresie PTEN. NNE apendiculare se corelează semnificativ cu expresia înaltă PTEN ($P=0,02$). Profilul imunohistochimic în ACC a fost heterogen. Expresia imunohistochimică absentă/slabă s-a corelat cu stadiile clinice avansate ($P=0,0007$), prezența metastazelor limfonodulare ($P=0,008$) și invazia limfovasculară ($P=0,01$).

Imunoreacțiile pentru **mTOR** (clona Y391, Abcam), efectuate sub control extern pozitiv, au evidențiat pozitivarea celulelor tumorale cu pattern citoplasmatic, ușor granular. Am remarcat frecvența mai mare a tumorilor primare cu expresie mTOR înaltă (40,8%), în comparație cu metastazele hepatice (16,9%). Expresie mTOR înaltă s-a corelat semnificativ statistic cu gradul înalt de malignitate ($P=0,0003$), stadiul clinic avansat ($P=0,0001$) și prezența metastazelor limfonodale ($P=0,001$).

Toate cazurile au fost evaluate imunohistochimic cu anticorpul monoclonal **pAkt** (clona LP18, Novocastra). Sub control extern pozitiv, populația tumorală NE a demonstrat reactivitate citoplasmatică și nucleară, de intensitate variabilă. Atât NNE primare, cât și metastazele hepatice au exprimat pAkt în proporții aproximativ egale (67,3% și 68,4%). Am remarcat corelația semnificativă dintre supraexpresia pAkt și gradul înalt de malignitate ($P=0,0003$), stadiile clinice incipiente ($P=0,002$) și stadiul pN ($P=0,04$).

3. DISCUȚII

NNE reprezintă un grup complex, heterogen de proliferări tumorale epiteliale, entități lezionale distincte care variază de la tumori neuroendocrine bine diferențiate cu evoluție indolentă până la CNE cu agresivitate înaltă. În ultimii ani asistăm la o explozie de informații științifice despre mecanismele moleculare implicate în apariția acestor tumori, relațiile clinico-patologice particulare în funcție de localizare,

identificarea unor markeri prognostici și terapeutici (SSTR, anomalii ale căilor de semnalizare PI3K/AKT/mTOR și Notch) [22].

Cele mai recente studii bine documentate arată tendința crescătoare a incidenței NNE. În ultimii 40 de ani, incidența tumorilor neuroendocrine a crescut de 3,6 ori în Statele Unite ale Americii și de 3,8 - 4,8 ori în Europa. Incidența raportată în America de Nord este de 2,5 - 5/100.000 locuitori/an, însemnând 8.000 - 16.000 de cazuri noi/an [22], respectiv 0,5% din tumorile maligne nou diagnosticate și 2% din tumorile maligne ale tractului gastro-intestinal [1;23]. Tumorile neuroendocrine sunt mai frecvente la femei decât la bărbați, cu un raport de 2,5:1 [1].

În studiul nostru, NNE gastro-intestinale, diagnosticate pe parcursul a 11 ani într-o singură instituție medicală, au fost identificate ușor mai frecvent la bărbați (52,1%) decât la femei (47,9%). Am remarcat creșterea semnificativă a numărului de cazuri după vârsta de 50 ani, predominant la bărbați. Sub 49 ani, tumorile neuroendocrine au fost notate mai frecvent la femei. În concordanță cu datele din literatură, am remarcat frecvența crescută a tumorilor neuroendocrine de colon stâng (18,3%) și drept (15,5%) [6]. Repartiția pe ani de studiu a evidențiat creșterea importantă a numărului de cazuri începând cu anul 2016. Metastazele hepatice ale NNE au prezentat o distribuție uniformă de-a lungul anilor.

În 61 de cazuri s-a intervenit endoscopic sau chirurgical cu scop diagnostic și/sau curativ, iar tumorile au fost stadializate conform recomandărilor OMS [4] și AJCC, ediția a 8-a [10]. Doar 3 tumori (o tumoră gastrică și două tumori de colon stâng și rect) au fost rezecate prin polipectomie endoscopică, diagnosticate și stadializate ca tumori neuroendocrine bine diferențiate G1, pT1. Cele mai numeroase NNE au fost diagnosticate în stadii avansate, fiind identificate 27 de cazuri pT3 și pT4 (64,3%), în comparație cu 15 cazuri (35,7%) în stadiile pT1 și pT2. 54,8% din cazuri au prezentat metastaze limfonodulare în unul sau mai mulți limfonoduli. Am întâlnit aspecte de invazie limfovaculară în 59,5% și invazie perineurală în 33,3% din NNE studiate.

Efectele somatostatinei, hormon peptidic care inhibă creșterea celulară și secreția hormonală a celulelor tumorale, sunt mediate prin interacțiunea cu familia de receptori de somatostatina SSTR1-SSTR5 [24,25]. NNE primare s-au pozitivat pentru SSTR2 în 67,3% din cazuri, mai frecvent decât metastazele hepatice ale NNE (57,9%), rezultate concordante cu datele din literatură [26]. Datele studiului nostru, publicate în literatura de specialitate [27], arată corelația semnificativă dintre expresia SSTR2 și gradul de diferențiere tumorală ($P=0,0004$). Aceeași corelație a fost remarcată și în cadrul tumorilor neuroendocrine bine diferențiate. Toate cazurile din stadiile incipiente de boală neoplazică au fost pozitive pentru SSTR2, procent mult mai mare decât cel întâlnit în cazul tumorilor în stadii avansate (56,8%). Rezultatele noastre sunt susținute de studiul lui Wang și colab., care au urmărit 143 de pacienți cu tumori neuroendocrine gastro-entero-pancreatice și care demonstrează rolul cheie al SSTR2 ca factor de prognostic favorabil [28]. Datele noastre nu arată o corelație statistic semnificativă între expresia SSTR2 și stadiul pN sau invazia limfovaculară, deși tumorile fără emboli tumorali intravasculari au fost SSTR2 pozitive mult mai frecvente (100%) decât tumorile cu invazie limfovaculară (56%). Absența invaziei perineurale apare semnificativ mai frecvent în NNE gastro-intestinale SSTR2 pozitive ($P=0,04$). Am

remarcat corelația semnificativă ($P < 0,0001$) dintre expresia crescută pentru SSTR5 și tipul tumoral.

Chemokinele, familie de citokine secretate de celule epiteliale și stromale [29,30], mediază numeroase procese celulare implicate în semnalizarea și migrarea celulară. Ele își exercită funcția prin interacțiunea cu receptori membranari specifici [31]. Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G1 au prezentat expresie scăzută în 75% din cazuri ($P = 0,0002$), în timp ce NNE G3 au avut expresie CXCR4 înaltă în 63,6% din cazuri. Cercetarea noastră demonstrează asocierea dintre scorul CXCR4 scăzut, stadiile clinice incipiente ($P = 0,0002$), absența embolilor tumorali intravasculari ($P = 0,0002$) și absența invaziei perineurale ($P = 0,007$). În studiul nostru, expresia CXCR4 înaltă este un factor de prognostic negativ în NNE gastro-intestinale.

Proteina PTEN (proteina omolog a fosfatazei și tensinei) este un reglator negativ pentru calea de semnalizare fosfatidilinozitol-3-kinază (PI3K)/protein-kinaza B (Akt) [32], implicată în creșterea și supraviețuirea celulară. Studiul imunohistochimic a relevat pierderea expresiei PTEN semnificativ mai frecvent în metastazele hepatice ale NNE, în comparație cu NNE primare ($P = 0,003$). Rezultatele noastre, în concordanță cu cercetările lui Wang și colab. [33] și Krausch și colab. [34], au arătat corelația semnificativă dintre expresia PTEN absentă/slabă și gradul înalt de malignitate ($P = 0,003$), stadiile clinice avansate ($P = 0,0007$), stadiul pN ($P = 0,008$) și invazia limfovaculară ($P = 0,01$). Expresia imunohistochimică absentă/slabă a PTEN apare ca factor de prognostic negativ, fiind semnalată în 4 cazuri de tumori neuroendocrine G1 și o tumoră neuroendocrină G1 apendiculară, cazuri care necesită abordare terapeutică mai agresivă și supraveghere atentă.

Calea de semnalizare PI3K/Akt joacă un rol important în carcinogeneză. Prin intermediul acesteia se produc mutații activatoare la nivelul oncogenei PI3KCA sau inactivatoare ale genei PTEN [35]. Rata de pozitivare imunohistochimică pentru pAkt a fost egală în NNE primare și secundare, ceea ce sugerează că diseminarea tumorală nu se asociază cu fenomenul de reducere a fosforilării Akt. Tumorile gastrice și tumorile colonului stâng au prezentat cele mai numeroase cazuri cu expresie Akt moderată/înaltă ($P = 0,0005$ și respectiv, $P < 0,0001$). Am remarcat asocierea dintre expresia înaltă pentru Akt și gradul de diferențiere tumorală, semnificativă statistic pentru CNE ($P = 0,0001$). Conform rezultatelor noastre, testarea inhibitorilor Akt nu reprezintă o prioritate în tumorile neuroendocrine G3, însă sunt necesare mai multe studii clinice prospective care să includă un număr mare de pacienți.

În studiul nostru am observat pozitivarea imunohistochimică a mTOR într-o proporție mult mai mare de cazuri decât cele raportate anterior în literatură, probabil datorită numărului crescut de NNE de grad înalt. Expresia markerului este mai redusă la nivelul metastazelor hepatice decât în tumorile primare, ceea ce sugerează posibilul răspuns optim la terapia cu inhibitori de mTOR doar în cazul tumorilor neuroendocrine primare localizate. Rezultatele noastre arată corelația semnificativă dintre expresia înaltă a markerului și gradul înalt de malignitate ($P = 0,0003$), localizarea tumorii la nivelul colonului drept ($P = 0,03$), stadiile clinice avansate ($P = 0,0001$) și stadiul pN ($P = 0,001$). Tumorile neuroendocrine G3 și CNE au exprimat mTOR în 71,4% și respectiv, 83,3% din cazuri, ceea ce indică faptul că terapia cu analogi de rapamicină este extrem de promițătoare în formele tumorale agresive.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

- În studiul nostru, NNE gastro-intestinale au fost ceva mai frecvente la sexul masculin (52,1%).
- Numărul cazurilor diagnosticate a crescut semnificativ în ultimii 3 ani de studiu, în special prin creșterea incidenței NNE gastrice, ale intestinului subțire și apendicelui. Metastazele hepatice au prezentat o distribuție uniformă de-a lungul anilor, ceea ce demonstrează caracterul constant agresiv al acestor tumori.
- Cei mai importanți factori clinico-morfologici și imunohistochimici asociați tumorilor neuroendocrine bine diferențiate G1 au fost: dezvoltarea în exclusivitate la femei sub vârsta de 50 de ani; localizarea frecventă în intestinul subțire (29,7%) și colonul stâng (18,5%); imunoreacțiile frecvent negative pentru CgA în tumorile colonului stâng și rectului (40%); gradul de agresivitate mai crescut pentru tumorile gastrice.
- Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G2 s-au întâlnit predominant după vârsta de 50 de ani, atât la bărbați, cât și la femei, localizate mai frecvent la nivelul stomacului (22,2%) și colonului drept (16,7%).
- Tumorile neuroendocrine bine diferențiate G3 au fost diagnosticate după vârsta de 60 de ani, la ambele sexe, mai ales ca metastaze hepatice (57,1%). În funcție de activitatea proliferativă, cele mai agresive tumori au fost cele localizate în colonul drept.
- ACC s-au dezvoltat predominant la bărbați vârstnici și au avut un IP Ki-67 mediu de 20,5%, semnificativ mai mic decât IP Ki-67 mediu al tumorilor neuroendocrine G3 (35,7%).
- NNE studiate au fost diagnosticate în stadii clinice avansate (64,3% din cazuri), cu metastaze limfonodulare în 54,8% din cazuri.
- În concordanță cu alte studii, afirmăm că IP Ki-67 este un important factor de prognostic pentru NNE gastro-intestinale. IP Ki-67 s-a corelat semnificativ cu stadiul pT ($P = 0,01$), stadiul clinic ($P = 0,004$) și invazia perineurală ($P = 0,02$).
- În studiul nostru, stadiul pN și invazia limfovasculară nu s-au corelat cu activitatea proliferativă a NNE gastro-intestinale.
- Dintre variantele cele mai agresive, menționăm NNE ale colonului drept, slab diferențiate în 55,6% din cazuri, toate fiind diagnosticate ca tumori pT3 (33,3%) și pT4 (66,7%). Acestea au asociat metastaze în limfonodulii regionali în 77,8% din cazuri și emboli tumorali intravasculari în 88,9% din cazuri.
- Rezultatele obținute ne permit să afirmăm că imunohistochimia este o metodă fiabilă, relativ ieftină, deosebit de utilă pentru identificarea profilului SSTR în NNE gastro-intestinale.
- Rezultatele noastre au arătat corelația inversă dintre expresia imunohistochimică a SSTR2, gradul de malignitate ($P=0,0004$) și tipul tumoral ($P<0,0001$). SSTR pot fi considerați factori de prognostic, oferind informații despre tratamentul, evoluția și supraviețuirea pacienților.
- Pozitivarea SSTR2 în MiNEN, CNE și ACC indică beneficiul tratamentului cu SSA, asociat tratamentului chirurgical și chimioterapic, însă rezultatele noastre

trebuie validate în trialuri prospective largi, care să includă un număr mai mare de cazuri.

- Rezultatele noastre susțin corelația dintre expresia CXCR4 și gradul diferențierii tumorale. Scorul de imunoreactivitate CXCR4 a crescut proporțional cu agresivitatea tumorală.
- Datele noastre au arătat asocierea dintre expresia CXCR4 scăzută, stadiile clinice incipiente ($P=0,0002$), absența embolilor tumorali intravasculari ($P=0,0002$) și absența invaziei perineurale ($P=0,007$). Expresia CXCR4 nu s-a corelat cu stadiul pN.
- Rezultatele noastre au demonstrat corelația dintre pierderea expresiei genei supresoare tumorală PTEN și stadiile clinice avansate ($P=0,0007$), metastazele limfonodulare ($P=0,008$) și invazia limfovaculară ($P=0,01$). Pierderea expresiei PTEN este un marker de prognostic advers în NNE gastro-intestinale.
- Am remarcat corelația dintre expresia înaltă pentru mTOR și vârsta înaintată a pacienților, localizarea tumorilor la nivelul colonului drept ($P=0,03$), gradul înalt de malignitate ($P=0,0003$), stadiul tumoral avansat ($P=0,0001$) și stadiul pN1 ($P=0,001$). Având în vedere rezultatele noastre, avansăm ipoteza că inhibitorii de mTOR administrați pacienților cu tumori invazive, diseminate, nu reprezintă decizia terapeutică optimă.
- În studiul nostru, pozitivarea imunohistochimică moderată și intensă a Akt fosforilat a fost remarcată în special în tumorile colonului stâng ($P<0,0001$) și gastrice ($P=0,0005$), de grad înalt ($P=0,0003$). Supraexpresia imunohistochimică a markerului Akt este predictivă pentru răspunsul terapeutic bun la terapia cu inhibitori Akt.
- Rezultatele noastre au arătat corelația semnificativă dintre expresia înaltă Akt, prezența invaziei limfovaculară ($P=0,05$) și stadiul pN1 ($P=0,04$), ceea ce confirmă rolul important al activării Akt în diseminarea limfovaculară a celulelor tumorale NE.
- Unele rezultate ale studiului nostru au valoare limitată, în primul rând datorită numărului redus de cazuri din anumite categorii lezionale, însă foarte puține cercetări în domeniu includ loturi mari de pacienți și în al doilea rând, datorită absenței informațiilor clinice despre evoluția și supraviețuirea pacienților. Considerăm că rezultatele noastre trebuie validate în studii largi, multicentrice și ne propunem să realizăm astfel de cercetări în viitor.
- Tehnicile imunohistochimice optimizate pentru SSTR, PTEN, CXCR4, mTOR și Akt fosforilat sunt relativ ieftine, reproductibile și aduc informații deosebit de utile pentru stabilirea rolului acestor markeri ca factori de prognostic pozitivi sau negativi, predictibili pentru evoluția și supraviețuirea pacienților cu NNE gastro-intestinale. În absența criteriilor morfologice, investigațiile imunohistochimice pentru markerii moleculari permit selecția și stratificarea acurată a pacienților pe grupe de risc, cu implicații evolutiv-prognostice și terapeutice.

Bibliografie

1. Ahmed M. Gastrointestinal neuroendocrine tumors in 2020. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2020 Aug 15;12(8):791–807.
2. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1;3(10):1335–42.
3. Mocellin S, Nitti D. Gastrointestinal carcinoid: Epidemiological and survival evidence from a large population-based study (n = 25 531). *Ann Oncol*. 2013 Dec 1;24(12):3040–4.
4. Klimstra DA, Kloppel G, La Rosa S RG. Classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. *WHO Classification of Tumours Digestive System Tumours*. 5th ed. 2019:16–9.
5. Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gönen M, et al. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: Application of the delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):300–13.
6. Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol*. 2011 Aug;92(4):219–31.
7. Sternini C, Anselmi L, Rozengurt E. Enteroendocrine cells: A site of “taste” in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008 Feb;15(1):73–8.
8. Cockburn Amber RTA. Fenoglio-Preiser’s Gastrointestinal Neuroendocrine Lesions. In: Noffsinger AE, editor. *Gastrointestinal Pathology*. Fourth Ed. Wolters Kluwer; 2017:2300–2512.
9. Mafficini A, Scarpa A. Genetics and epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Rev*. 2019;40(2):506–36.
10. *AJCC Cancer Staging Manual*. Eighth Ed. New York Springer; 2017.
11. Ishida M, Sekine S, Fukagawa T, Ohashi M, Morita S, Taniguchi H, et al. Neuroendocrine carcinoma of the stomach morphologic and immunohistochemical characteristics and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):949–59.
12. Wang R, Zheng-Pywell R, Chen HA, Bibb JA, Chen H, Rose JB. Management of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2019 Oct 24;12:117955141988405.
13. Howe JR, Cardona K, Fraker DL, Kebebew E, Untch BR, Wang YZ, et al. The surgical management of small bowel neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2017;46(6):715–31.
14. Nussbaum DP, Speicher PJ, Gulack BC, Keenan JE, Ganapathi AM, Englum BR, et al. Management of 1- to 2-cm carcinoid tumors of the appendix: Using the national cancer data base to address controversies in general surgery. *J Am Coll Surg*. 2015 May 1;220(5):894–903.
15. Pape UF, Niederle B, Costa F, Gross D, Kelestimur F, Kianmanesh R, et al. ENETS consensus guidelines for neuroendocrine neoplasms of the appendix

- (excluding goblet cell carcinomas). In: *Neuroendocrinology*. S. Karger AG; 2016:144–52.
16. Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: A report from the PROMID study group. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4656–63.
 17. Rinke A, Wittenberg M, Schade-Brittinger C, Aminossadati B, Ronicke E, Gress TM, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide lar in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors (PROMID): Results of long-term survival. *Neuroendocrinology*. 2016 Nov 1;104(1):26–32.
 18. Mitry E, Walter T, Baudin E, Kurtz JE, Ruszniewski P, Dominguez-Tinajero S, et al. Bevacizumab plus capecitabine in patients with progressive advanced well-differentiated neuroendocrine tumors of the gastro-intestinal (GI-NETs) tract (BETTER trial) - A phase II non-randomised trial. *Eur J Cancer*. 2014;50(18):3107–15.
 19. Yoo C, Cho H, Song MJ, Hong SM, Kim K, Chang HM, et al. Efficacy and safety of everolimus and sunitinib in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Jan 1;79(1):139–46.
 20. Severi S, Grassi I, Nicolini S, Sansovini M, Bongiovanni A, Paganelli G. Peptide receptor radionuclide therapy in the management of gastrointestinal neuroendocrine tumors: efficacy profile, safety, and quality of life. *OncoTargets Ther*. 2017 Jan 27;10:551–7.
 21. Hicks RJ, Kwekkeboom DJ, Krenning E, Bodei L, Grozinsky-Glasberg S, Arnold R, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabelled Somatostatin Analogues. In: *Neuroendocrinology*. S. Karger AG; 2017:295–309.
 22. La Rosa S, Uccella S. Classification of neuroendocrine neoplasms: lights and shadows. *Rev Endocr Metab Disord*. 2021 Sep;22(3):527–538.
 23. Pellat A, Coriat R. Well Differentiated Grade 3 Neuroendocrine Tumors of the Digestive Tract: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2020 Jun 1;9(6):1677.
 24. Qian ZR, Li T, Ter-Minassian M, Yang J, Chan JA, Brais LK, et al. Association between Somatostatin Receptor Expression and Clinical Outcomes in Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2016;45(10):1386–93.
 25. Mehta S, De Reuver PR, Gill P, Andrici J, D’Urso L, Mittal A, et al. Somatostatin receptor SSTR-2a expression is a stronger predictor for survival than Ki-67 in pancreatic neuroendocrine tumors. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Oct 9;94(40):e1281.
 26. Qian ZR, Li T, Ter-Minassian M, Yang J, Chan JA, Brais LK, et al. Association between Somatostatin Receptor Expression and Clinical Outcomes in Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2016;45(10):1386–93.
 27. Popa O, Taban SM, Pantea S, Plopeanu AD, Barna RA, Cornianu M, et al. The new WHO classification of gastrointestinal neuroendocrine tumors and

- immunohistochemical expression of somatostatin receptor 2 and 5. *Exp Ther Med*. 2021;22(4):1179.
28. Wang Y, Wang W, Jin K, Fang C, Lin Y, Xue L, et al. Somatostatin receptor expression indicates improved prognosis in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm, and octreotide long-acting release is effective and safe in chinese patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol Lett*. 2017 Mar 1;13(3):1165–74.
 29. Smith H, Whittall C, Weksler B, Middleton J. Chemokines stimulate bidirectional migration of human mesenchymal stem cells across bone marrow endothelial cells. *Stem Cells Dev*. 2012 Feb 10;21(3):476–86.
 30. Howard OMZ, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ. Chemokines: Progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol*. 1996;14(2):46–51.
 31. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*. 2014;124:31–82.
 32. Downes CP, Ross S, Maccario H, Perera N, Davidson L, Leslie NR. Stimulation of PI 3-kinase signaling via inhibition of the tumor suppressor phosphatase, PTEN. *Adv Enzyme Regul*. 2007 Jan 1;47(1):184–94.
 33. Wang L, Ignat A, Axiotis CA. Differential Expression of the PTEN Tumor Suppressor Protein in Fetal and Adult Neuroendocrine Tissues and Tumors: Progressive Loss of PTEN Expression in Poorly Differentiated Neuroendocrine Neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Jun;10(2):139–46.
 34. Krausch M, Raffel A, Anlauf M, Schott M, Willenberg H, Lehwald N, et al. Loss of PTEN expression in neuroendocrine pancreatic tumors. *Horm Metab Res*. 2011;43(12):865–71.
 35. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Feb;13(2):140–56.