
Aspecte imunohistochimice, moleculare și utilizarea unor markeri predictivi în cancerul urovezical la bovine

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand Raluca Vidrighinescu

Conducător de doctorat Prof.univ. dr. Cornel Cătoi



INTRODUCERE

Leziunile vezicii urinare ocupă un loc din ce în ce mai pregnant în patologia tumorală, iar bovinele pot reprezenta un model animal experimental pentru studierea patogenezei neoplasmelor vezicale. În cadrul patologiei urovezicale la bovine, cele mai frecvente leziuni sunt inflamațiile mucoasei vezicale. Cistitele au o etiologie factorială foarte variată, printre cauzele cel mai frecvente numărându-se infecțiile bacteriene, administrarea de medicamente ce induc antibioretistență, expunerea la anumite toxice sau substanțe chimice, cum ar fi metaboliții ciclofosfamidei sau ingestia de plante toxice. Cistita toxică (Hematuria enzootică cronică (HEC) / Cistita hemoragică) este dată de ingestia cronică de ferigă imperială (*Pteridium spp.*) care produce sindromul hematuriei cronice enzootice la bovine și se manifestă prin hemoragii acute ale vezicii urinare, cistită cronică sau neoplazii urovezicale ale tractului urinar inferior, în special în vezica urinară.

Bovinele hrănite cu cantități mici de ferigă prezintă hematurie microscopică, urmată de hematurie macroscopică. Microhematuria este asociată cu echimoze sau sufuziuni în uroteliul calicelor renale, pelvis, ureter și vezică. Microscopic se constată ectazia și congestia capilară. Aceste alterări vasculare predispun la hemoragii în peretele vezical sau intraluminale, precum și la leziuni nodulare hemangiomatoase în regiunile afectate. Hematuria se instalează insidios, se caracterizează printr-un curs lent, dar progresiv, cu remisiuni de durată variabilă, de la câteva zile la câteva luni.

Neoplasmele care se dezvoltă la nivel vezical sunt de natură epitelială și mezenchimală, atât benigne cât și maligne. Literatura de specialitate remarcă faptul ca cele de natură epitelială benignă cunosc o incidență mai mare în rândul tumorilor uroteliale, cele mai întâlnite fiind leziunile de tip papilomatos.

De mare interes pentru studiul leziunilor preneoplazice și al tumorilor vezicale este și analiza altui factor patogen implicat, și anume virusul papilomatozei bovine. Studiile moleculare au demonstrat prezența ADN-ului viral în biopsiile de mucoasă vezicală recoltată, însă nu este pe deplin elucidată legătura dintre acesta și consumul de ferigă.

Cuvinte cheie: hematurie enzootică bovină, BPV, tumori vezicale

STRUCTURA LUCRĂRII

Lucrarea intitulată "Aspecte imunohistochimice, moleculare și utilizarea unor markeri predictivi în cancerul urovezical la bovine" conține 125 de pagini și este redactată conform normelor în vigoare în două părți.

Prima parte cuprinde 28 de pagini, structurate în 7 capitole și sintetizează cadrul general actual al cunoașterii legat de aspecte epidemiologice ale leziunilor urovezicale la bovine, clasificarea histologică a tumorilor vezicii urinare și ale uretrei, etiologia și mecanismele patogenetice implicate în dezvoltarea neoplasmelor urovezicale, precum și markeri imunohistochimici utilizați în diagnosticarea tumorilor.

Partea a II-a, extinsă pe 76 de pagini, cuprinde cercetările personale realizate în perioada 2011 – 2015. Fiecare capitol este structurat în subcapitole ce prezintă scopul și obiectivele, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra noutății acestora comparativ cu alte studii efectuate și concluziile parțiale aduse în urma efectuării studiului. Rezultatele cercetării sunt ilustrate într-un număr de 30 de figuri și sintetizate în 10 tabele.

REZULTATELE CERCETĂRII

Capitolul 9, intitulat "Evaluarea macroscopică și histopatologică a leziunilor urovezicale" cuprinde evaluarea din punct de vedere macroscopic și histopatologic a biopsiilor recoltate de la nivel urovezical la bovinele sacrificate și clasificarea tuturor modificărilor întâlnite, efectuând o evidență cu leziunile diagnosticate.

Pentru acest studiu au fost recoltate probe de vezică urinară de la un număr de 475 de bovine, masculi și femele, cu vârste cuprinse între 3 și 15 ani, provenind din zone în care se cunoaște caracterul endemic al hematuriei cronice. Majoritatea bovinelor sacrificate nu prezentau semne clinice antemortem, modificările întâlnite la nivelul vezicii fiind surpriză de abator.

În vederea efectuării examenului histopatologic aceste țesuturi au fost introduse în agent de fixare (formol 10%, pH 7) timp de 24 de ore, ulterior fiind prelucrate prin includerea la parafină și colorate folosind tehnica uzuală hematoxină-eozină. În urma examinării anatomopatologice macroscopice și histopatologice a vezicilor urinare au fost identificate o serie de modificări de natură circulatorie, inflamatorie, preneoplazică și neoplazică. Din totalul biopsiilor studiate 370 au fost reprezentate de

mucoasă cu epiteliu normal (fără modificări patologice); 32 de fragmente urovezicale au prezentat leziuni inflamatorii, și anume cistite cronice în majoritatea cazurilor. În 6 cazuri au fost identificate leziuni de hiperplazie urotelială, fără a fi prezent și infiltratul inflamator. Leziunile tumorale au fost reprezentate de neoplazii benigne (în majoritatea cazurilor papiloame), 32 la număr, și de tumori maligne, 27. În 8 cazuri am întâlnit leziuni vasculare, cuprinzând hemoragii și edeme subepiteliale, neînsoțite de inflamație.

Cu toate ca infecția cu papilomavirus determină în unele epiteliu incluzii intranucleare, în urma examenului histopatologic putem afirma faptul ca în acest studiu nu au fost identificate astfel de incluzii intranucleare la nivelul epitelului tranzițional.

Putem concluziona astfel că inflamațiile cronice ale vezicii urinare se asociază cu o serie de modificări hiperplazice, metaplazice și displazice ale mucoasei. Carcinoamele urovezicale au un comportament agresiv, determinând infiltrarea structurilor tisulare subiacente, necroză tisulară și invazie vasculară.

Capitolul 10, intitulat "Evaluarea diferiților markeri imunohistochimici în leziunile preneoplazice și neoplazice urovezicale" cuprinde evaluarea expresiei unor markeri imunohistochimici de diagnostic și proliferare nucleară în leziunile preneoplazice și neoplazice ale vezicii urinare întâlnite la bovine. Materialul biologic a constat în 50 de fragmente de mucoasă urovezicală, evaluate prin examen histopatologic, folosind colorația standard și examen imunohistochimic, utilizând următorii anticorpi monoclonali: anti-panCK (clona AE1/AE3/ Leica, UK), anti CK20 (clona PW31/Novocastra, UK), anti E-caderina (clona 36B5/ Leica, UK) și anti Ki-67 (clona MM1/ Leica, UK).

În studiul nostru expresia panCK, caracterizată prin marcarea în nuanțe de brun a citoplasmei celulare epiteliale, a fost intens exprimată în mucoasa normală (intensitate de gradul 3), aceasta fiind considerată de noi martor pozitiv, iar în funcție de aceasta am evaluat expresia IHC în celalalte loturi analizate. O expresie intensă a panCK am observat și în loturile 3, 4 și 6, respectiv în leziuni de hiperplazie, displazie epitelială/carcinom in situ și neoplasme uroteliale papilare cu grad redus de malignitate. În ceea ce privește alte leziuni luate în studiu (inflamatorii și tumorale maligne), acest marker s-a exprimat cu o intensitate moderată. Expresia CK20 a fost negativă atât în mucoasa urotelială normală (martor pozitiv) cât și în leziunile urovezicale. Expresia citokeratinei în raport cu severitatea procesului neoplazic nu a prezentat o variație a acesteia, nici o variație a distribuției acesteia la nivel citoplasmatic.

Epiteliul tranzițional normal a exprimat o puternică imunoreactivitate a E-caderinei la nivel intercelular. Acest lucru a fost observat în toate cazurile considerate

cu mucoasă fără leziuni. În biopsiile de mucoasă urovezicală cu cistite cronice, focarele lezionale au exprimat o imunoreactivitate moderată și omogenă a E-caderinei comparativ cu epitelium normal. În fragmentele tisulare cu leziuni neoplazice (carcinom tranzițional, carcinom spinocelular), imunoreactivitatea E-caderinei a fost de asemenea moderată și omogenă în epitelium displazic de la suprafața proceselor neoplazice. Zonele neoplazice maligne au exprimat o imunoreactivitate slabă și neomogenă a E-caderinei, în multe câmpuri microscopice fiind negativă.

Expresia Ki-67 în epitelium tranzițional normal a fost negativă, neobservându-se nuclei marcați în nuanțe de brun. În lotul cu mucoasă inflamată cronic, celulele imunopozitive la Ki-67 au fost reprezentate doar de câteva celule inflamatorii (limfocite), celulele uroteliale integre fiind imunonegative. De asemenea, tot negativ a fost și lotul biopsiilor cu hiperplazie epitelială, neobservându-se în nici un câmp microscopic celule imunopozitive. În ceea ce privește leziunile neoplazice, am observat o creștere a mediei expresiei indicelui Ki-67, mai puțin la nivelul papiloamelor, unde aceasta a fost de 2.34%. Se observă o ușoară creștere numerică a nucleilor marcați începând cu lotul în care s-a diagnosticat displazia epitelială/carcinom in situ, și anume 5,40%. În neoplasmul urotelial papilar cu grad redus de malignitate media expresiei Ki-67 a fost de 5,16%, aceasta demonstrând necesitatea diferențierii acestui tip de neoplasm în comparație cu papiloamele. Cea mai intensă expresie imunohistochimică a fost observată în cazul carcinoamelor, și în special în cazul carcinoamelor tranziționale infiltrative, 29%. Între toate loturile analizate s-a identificat o variație a mediei expresiei indicelui Ki-67, astfel o expresie mai crescută observându-se în PUNLMP și carcinomul tranzițional. În urma realizării testului de comparații multiple Turkey-Kramer s-au obținut valori intens semnificative ($p < 0.001$) între toate loturile luate în studiu, mai puțin între displazii și PUNLMP. Creșterea treptată direct proporțională cu creșterea malignității neoplasmului demonstrează utilitatea folosirii acestui marker în diagnosticarea corectă și precoce a proceselor tumorale.

Capitolul 11, intitulat "Caracterizarea morfologică, histochimică și imunohistochimică a focarelor de *Cystitis glandularis* din leziunile inflamatorii și neoplazice urovezicale", cuprinde evaluarea și compararea expresiei markerilor CDX2, CK7, CK20, Ki-67 și E-caderină în procesele de metaplazie intestinală întâlnite în urocistitele cronice și cancerul urovezical la bovine.

Pentru acest studiu au fost utilizate 24 de biopsii de mucoasă urovezicală, împărțite în 3 loturi, astfel: lotul 1 – mucoasă normală (5 indivizi), lotul 2 - cistită cronică (6 indivizi) și lotul 3 (13 indivizi) - neoplasme urovezicale. Acestea au fost colorate hematoxilină-eozină și AB-PAS (pentru identificarea celulelor Globet cu mucină), apoi imunohistochimic, utilizând anticorpii monoclonali anti-CDX2 (clona AMT28/ Novocastra, UK), panCK (clona AE1/AE3/ Leica, UK) CK7 (clona

RN7/Novocasta, UK), CK20 (clona PW31/Novocasta, UK), Ki-67 (clona MM1/ Leica, UK) și E-caderină (clona 36B5/ Leica, UK).

Expresia CDX2 nu a fost observată în mucoasa urovezicală normală. În lotul 2, cu cistite cronice, dintr-un număr de 6 cazuri, expresia CDX2 a fost identificată într-un singur caz în care aceasta a avut un caracter difuz, marcând toate zonele cu aspecte morfologice de metaplazie intestinală. De asemenea, la lotul 3, dintr-un număr total de 13 cazuri cu neoplasme urovezicale, într-un singur caz cu carcinom spinocelular infiltrativ s-a observat un focar cu celule pozitive la CDX2, restul zonelor cu aspecte morfologice de metaplazie intestinală rămânând nemarcate.

PanCK, caracterizată prin marcarea în nuanțe de brun a citoplasmei celulare epiteliale, a fost intens exprimată atât în mucoasa normală cât și în leziunile urovezicale inflamatorii și tumorale. PanCK a fost mai slab exprimată (1+) în focarele de metaplazie intestinală asociate cistitelor cronice comparativ cu cele prezente în tumorile urovezicale. Expresia CK20 și CK7 au fost negative atât în mucoasa intestinală normală (martor pozitiv) cât și în leziunile urovezicale.

Epiteliul tranzițional normal a exprimat o puternică imunoreactivitate a E-caderinei la nivel intercelular. În biopsiile de mucoasă urovezicală cu cistite cronice (lotul 2), focarele de metaplazie intestinală au exprimat o imunoreactivitate moderată și omogenă a E-caderinei comparativ cu epiteliul normal. În fragmentele tisulare cu leziuni neoplazice (carcinom tranzițional, carcinom spinocelular, adenocarcinom), imunoreactivitatea E-caderinei a fost de asemenea moderată și omogenă atât în focarele de metaplazie intestinală, cât și în epiteliul displazic de la suprafața proceselor neoplazice.

Media expresiei Ki-67 în focarele de metaplazie intestinală de la indivizii cu cistite cronice a fost de 20.8%, iar în cazul indivizilor cu procese neoplazice urovezicale, media expresiei Ki-67 în focarele de metaplazie intestinală a fost de 23.15%, neexistând diferențe semnificativ statistice între cele două loturi ($p > 0.05$). Zonele de neoplazie tumorală au exprimat o imunoreactivitate a Ki-67 de 49.38%. În urma realizării testului de comparații multiple între focarele de metaplazie intestinală și cele de neoplazie s-au obținut valori nesemnificative ($p > 0.05$).

Pe baza aspectelor morfologice și imunohistochimice evidențiate, putem afirma că aceste focare de metaplazie intestinală nu prezintă caracteristici maligne, prin urmare nu reprezintă un risc în dezvoltarea neoplasmelor maligne urovezicale, acestea coexistând cu leziunile tumorale.

Capitolul 12, intitulat "Extracția ADN-ului viral din bioptatele recoltate de la nivel urovezical", prezintă corelarea leziunilor urovezicale întâlnite cu infecția cu Papilomavirusul bovin, subtipurile BPV-1, 2 și 4, la o serie de bovine provenite din regiuni geografice unde hematuria cronică are un caracter enzootic.

Pentru aceasta s-au utilizat 19 biopsii de fragmente tisulare (mucoasă urovezicală), dintre care 14 cu leziuni (8 neoplazice și 6 non-neoplazice) și 5 fără leziuni. Din cele 14 fragmente cu leziuni, un caz a fost reprezentat de cistită cronică foliculară, 5 cazuri au constat în mucoasă urovezicală cu hemoragii epiteliale și subepiteliale, iar cele 8 cazuri de leziuni neoplazice au constat în: 3 cazuri de papiloame, două cazuri de carcinom papilar infiltrativ, un caz de carcinom papilar non-infiltrativ, un caz de adenocarcinom infiltrativ și un caz de carcinom tranzițional infiltrativ. Din acestea s-a extras ADN-ul total și a fost amplificat prin reacția în lanț a polimerazei, folosind primeri specifici pentru papilomavirusul bovin, subtipurile 1, 2 și 4.

În urma analizei PCR a probelor luate în studiu, 7 cazuri cu leziuni neoplazice din totalul celor 8 și unul din 5 fără leziuni au fost pozitive pentru BPV-2. Nu s-a identificat infecția cu BPV-2 în probele cu leziuni non-neoplazice. Pentru BPV-1 și BPV-4 toate cele 19 probe au fost negative.

Prezența virusului în mucoasa urovezicală normală, fără modificări patologice, demonstrează faptul că, în unele cazuri, infecția cu BPV-2 poate fi latentă, iar prin scăderea imunității sau suprapunerea acțiunii unor factori carcinogenici din mediu sau alimentație (spre exemplu feriga - *Pteridium spp*), acesta se poate activa, favorizând apariția leziunilor urovezicale.

Capitolul 13, intitulat "Analiza fractală - marker predictiv în diagnosticul cancerului urovezical la bovine", și-a propus evaluarea unui nou marker predictiv, analiza dimensiunii fractale, în leziunile preneoplazice și neoplazice uroteliale la bovine și demonstrarea utilității ei ca marker predictiv în diagnosticul tumoral în medicina veterinară.

În vederea atingerii scopului propus s-au utilizat preparate histologice colorate hematoxilină – eozină de la 40 indivizi împărțiți în 7 loturi: lotul 1 – mucoasă normală (fără modificări patologice); lotul 2 - cistite cronice; lotul 3 - hiperplazie epitelială; lotul 4 - displazie epitelială/carcinom in situ (CIS); lotul 5 – papilom urovezical; lotul 6 – neoplasm urotelial papilar cu grad redus de malignitate; lotul 7 - carcinom urotelial. În continuare s-au ales în mod randomizat nuclei caracteristici fiecărui caz în parte, importați în software-ul ImageJ™ (Wayne Rasband (HIH), U.S.A.) și supuși analizei fractale prin metoda „box-counting”. Rezultatele obținute au fost înregistrate și supuse analizei statistice, utilizându-se programele specializate M.S. Excel™ 2010 (Microsoft™, U.S.A.) și GraphPad InStat™ v3.05 (GraphPad™, U.S.A.).

Media gradului de complexitate a structurii interne a nucleilor celulari a variat între toate loturile studiate. Cea mai mare dimensiune fractală a fost găsită în cazul celulelor normale, $DF = 1,617 \pm 0,039$ (media \pm deviația standard), iar cea mai mică valoare a fost înregistrată la lotul 7 (carcinoame urovezicale), $DF = 1,550 \pm 0,042$.

Valori intermediare ale DF au fost regăsite la: lotul 2 – cistite cronice ($1,563 \pm 0,042$); lotul 3 – hiperplazie epitelială ($1,612 \pm 0,038$); lotul 4 – displazie epitelială/CIS ($1,580 \pm 0,065$); lotul 5 – papiloame ($1,573 \pm 0,050$); lotul 6 – PUNLMP ($1,559 \pm 0,064$). Se poate observa faptul că, la loturile cu PUNLMP și carcinoame, media dimensiunii fractale nucleare a fost mai redusă decât la celorlate loturi. Valorile semnificativ mai scăzute la aceste loturi denotă faptul că morfologia nucleului este diferită față de cea a nucleilor celulelor normale, aceștia din urmă având un aspect și o structură mai organizate (gradul de aranjare a cromatinei nucleare).

Testul ANOVA One Way a fost utilizat pentru a compara dimensiunile fractale între lotul cu mucoasă normală și cele cu mucoasă prezentând modificări patologice. S-a constatat că dimensiunile fractale nucleare ale celulelor urovezicale au urmat o distribuție normală. Diferențe cu o valoare p de 0.05 sau mai puțin au fost considerate semnificative statistic. S-a înregistrat o diferență semnificativă între valorile medii ale dimensiunilor fractale ale nucleilor celulari la indivizii cu mucoasă normală și cei cu modificări patologice ($p < 0.001$). În urma realizării testului de comparații multiple Turkey-Kramer s-au obținut valori extrem de semnificative ($p < 0.001$) între lotul 1 (lotul cu mucoasă normală) și toate celelalte loturi. În ceea ce privește compararea loturilor cu leziuni, s-au observat diferențe semnificative statistic doar între loturile 3 și 6, respectiv 3 și 7 (lotul 3-hiperplazie, lotul 6-PUNLMP, lotul 7-carcinom).

Lucrarea de față a demonstrat că celulele uroteliale maligne își pierd caracteristicile nucleare, aspect ce poate fi cuantificat prin analiza dimensiunii fractale (DF).

CONCLUZII GENERALE

1. Bovinele dezvoltă o patologie neoplazică urovezicală foarte variată, unele leziuni precum hiperplazia papilară, carcinomul in situ și PUNLMP (neoplasme uroteliale papilare cu grad redus de malignitate) nefiind clasificate de către WHO (2004), acestea regăsindu-se doar în patologia umană. Cele mai importante leziuni sunt reprezentate de cistitele cronice și neoplasmele urovezicale (carcinoamele tranziționale, carcinoamele squamoase și adenocarcinoamele).

2. Diversitatea tipurilor de neoplasme găsite în vezici recoltate de la bovine afectate de hematuria enzootică subliniază necesitatea de a urmări mai atent animalele din zonele în care se cunoaște prezența ferigii imperiale.

3. Interpretarea corectă a leziunilor non-neoplazice/preneoplazice asociate urocistitelor cronice reprezintă un factor important în diagnosticul precoce al cancerului urovezical.

4. Dintre markerii imunohistochimici utilizați, cel care și-a dovedit cel mai bine eficacitatea în diagnosticul și prognosticul tumoral a fost Ki-67 (marker de proliferare celulară).

5. Leziunile de *Cystitis glandularis* au fost identificate atât în inflamațiile cronice cât și în neoplasmele urovezicale; forma de metaplazie intestinală a fost întâlnită mult mai frecvent decât forma tipică de *Cystitis glandularis*.

6. Focarele de metaplazie intestinală, identificate inițial prin intermediul examenului histopatologic și apoi confirmate prin tehnica histochimică AB-PAS, au fost prezente doar la nivelul epitelului de suprafață, atât în cazul cistitelor cronice cât și în cazul neoplasmelor. Din punct de vedere morfologic nu au fost observate aspecte displazice în focarele de metaplazie intestinală, celulele fiind bine diferențiate și asemănătoare celulelor Goblet de la nivelul intestinului subțire (metaplazie intestinală completă).

7. De asemenea considerăm că aceste focare de metaplazie intestinală întâlnite în mucoasa vezicii urinare apar ca aspecte regenerative epiteliale asociate unor injurii cronice la acest nivel, fără un anumit potențial malign.

8. Cu ajutorul tehnicilor moleculare am demonstrat prezenta virusului papilomatozei bovine la nivelul biopsiilor de mucoasă urovezicală recoltate din abator. Cu toate că literatura de specialitate oferă date despre prezența subtipurilor virale 1 și 4, în probele luate în studiu acestea nu s-au regăsit.

9. Tulpina virală BPV-2 a fost întâlnită în 42% din probele studiate. ADN-ul viral a fost prezent în aproape toate procesele tumorale (singura excepție reprezentând-o tumoră benignă de tip papilomatos), lipsind în leziunile non-neoplazice.

10. Prezența virusului în mucoasa urovezicală normală, fără modificări patologice, demonstrează faptul că, în unele cazuri, infecția cu BPV-2 poate fi latentă, iar prin scăderea imunității sau suprapunerea acțiunii unor factori carcinogenici din mediu sau alimentație (spre exemplu feriga - *Pteridium spp*), acesta se poate activa, favorizând apariția leziunilor urovezicale.

11. În studiul nostru s-a utilizat pentru prima dată o analiză a dimensiunii fractale intranucleare a leziunilor urovezicale la bovine. Din punctul de vedere al biofizicii, rezultatele confirmă că răspunsul celulelor la factorii cancerigeni este prin modificarea complexității sale geometrice și prin scăderea dimensiunii fractale.

12. Lucrarea de față a demonstrat că celulele uroteliale maligne își pierd caracteristicile nucleare, aspect ce poate fi cuantificat prin analiza dimensiunii fractale (DF).

13. Există un merit de necontestat în utilizarea de modele animale pentru studierea patogenezei neoplasmelor vezicale, chiar dacă, deocamdată, nu poate fi făcută o asociere între gradul histologic al leziunilor vezicale și simptomatologia bovinelor, iar având în vedere că probele sunt obținute la sacrificare nici nu se pune deocamdată problema unui tratament sau urmărirea în dinamică a acestora.

RECOMANDĂRI

O extindere viitoare a lucrării de față constă în identificarea diferitelor căi de dezvoltare a fiecărui tip specific de neoplasm, respectiv o mai bună înțelegere a mecanismelor moleculare care joacă un rol important în carcinogeneza.

Pentru aceasta recomandăm extragerea ADN-ului viral al diferitelor tulpini de BPV și urmărirea frecvenței cu care fiecare se întâlnește în diverse areale geografice ale României.

Evaluarea metaplaziei intestinale în diferite neoplasme epiteliale, îndeosebi urovezicale, rămâne încă un subiect provocator și deschis pentru cercetători în realizarea de studii ulterioare în acest domeniu.