

# SEMNIFICAȚIA MECANISMELOR MOLECULARE IMPLICATE ÎN TRANSFORMAREA CELULARĂ CU PAPILOMAVIRUSURI UMANE (HPV) PENTRU MONITORIZAREA UNOR CANCERE UMANE

## **CONCLUZII GENERALE**

### **Obiectivul 1: stabilirea unor markeri de diagnostic precoce asociați transformării cu HPV**

1. ADN HPV a fost decelat în 79% din cazurile studiate (lavaje cervicale provenite de la paciente cu citologii normale și anormale).
2. Prevalența ADN HPV<sub>hr</sub> a fost crescută în populația generală, întâlnindu-se 29 cazuri cu infecție unică și 47 cazuri de coinfecții. HPV<sub>lr</sub> a fost decelat în infecții unice doar în 11 cazuri, iar în coinfecții în 14 cazuri.
3. În funcție de diagnosticul citologic, HPV a fost decelat în 75,5% din probele cu aspect normal/inflamator, în 87,5% ASCUS, 70,37% LSIL și în 90,9% HSIL/ carcinom ceea ce demonstrează că infecțiile cu HPV sunt frecvente.
4. Totuși, stratificarea după gradul de oncogenicitate al HPV și diagnostic citologic a arătat că în timp ce tipurile oncogenice au fost prezente în 100% din cazurile HSIL, numai 41,67% dintre pacientele cu citologie normală sau aspect inflamator prezintă HPV de risc crescut. ASCUS semnalează prezența unor celule scuamoase atipice cu semnificație neprecizată, dar s-a arătat că poate ascunde histologii CIN2-3. Prevalența papilomavirusurilor de risc crescut în grupul cu citologie ASCUS a fost crescut (85,71%) comparativ cu (78,95%) cel cu LSIL. Coinfecțiile cu mai

multe tipuri HPV s-au întâlnit la aproximativ o treime dintre pacientele cu LSIL și din grupul cu citologie normală / aspect inflamator. Pacientele cu ASCUS au reprezentat grupul cu cel mai mare procent de coinfectii (61,54%), ceea ce ar putea explica morfologiei atipice la această clasă citologică. În schimb, în grupul HSIL/CIS nu a existat decât o singură coinfectie (ambele genotipuri de risc crescut) ceea ce ar putea sugera că ipoteza selecției clonale a unui tip HPV oncogenic care persistă, producând în timp leziuni de risc crescut. În studiul nostru, infecțiile multiple cu HPVhr sunt frecvente la femeile tinere.

5. Cea mai mare prevalență a avut-o HPV16, care este implicat în 22% dintre infecțiile cu HPV în populația generală. HPV16 este un genotip cu capacitate mare de transformare, la fel ca și HPV18 identificat în 15% dintre infecții. Alte genotipuri cu risc crescut de inducere a cancerului cervical au fost decelate cu o rată semnificativ mai scăzută între 2-4 %.
6. Frecvența integrării virale (HPV16) a crescut proporțional cu severitatea leziunii. Deși în peste 70% din cazurile de forme severe și cancere, HPV se integrează (forme mixte și integrate), există totuși și în forme episomale (redat în figura 5.19). Rezultatele noastre arată că există o rată semnificativ crescută de integrare la paciente cu leziuni premaligne și maligne;
7. Estimarea prin PCR multiplex a ratei E2/E6 la pacientele analizate confirmă că PCR multiplex poate deveni o metodă foarte simplă de selectare a pacientelor cu o rată de risc crescută progresie carcinogenică

#### **8. p16INK4a - marker în screening-ul persistenței HPV;**

Analiza imunohistochimică a reactivității p16INK4a a demonstrat că:

- epiteliul cervical normal este p16INK4a negativ (imunohistochimic/ imunocitochimic), dar p16INK4a se transcrie de la locusul ARF la nivel bazal. Epiteliul cervical normal (endo și exocervical) nu reacționează cu anticorpii anti p16INK4a, ca și

zonele cu metaplazie imatură și matură, precum și ariile normale adiacente leziunilor CIN

- raportul probe p16INK4a-pozitive / probe p16INK4a-negative crește cu stadiul leziunii neoplazice. Supraexpresia proteinei p16INK4a este caracteristică alterărilor displazice și neoplazice a epiteliului cervical. Procentul de probe pozitive p16INK4a crește în sensul: CIN I - CIN II - CIN III - carcinom invaziv.
- Toate stadiile CIN și carcinom analizate au fost heterogene în ce privește expresia p16INK4a.
- Fenotipul imunohistochimic difuz în citoplasmă (considerat de alți autori ca negativ) l-am asociat s-a întâlnit frecvent în stadiile avansate.
- Imunohistochimia p16INK4a este un marker valoros în diagnosticul leziunilor neoplazice. Poate face distincția între displazia cervicală de grad înalt și mimetismele benigne ca atrofia cervicală, metaplazia scuamoasă imatură și leziuni inflamatorii reactive. Dată fiind specificitatea p16INK4a în detecția leziunilor neoplazice de grad înalt, aplicațiile sale în acest context sunt foarte utile pentru detecția displaziei de grad înalt și intervențiile chirurgicale ulterioare.
- Sunt necesare studii realizate la scală largă pentru a examina utilitatea clinică a imunocolorației p16INK4a în identificarea leziunilor de grad scăzut cu risc crescut de progresie (studiul nostru retrospectiv realizându-se pe un număr mic de cazuri).

Cuantificarea expresiei p16INK4a în preparatele citologice la nivel de ARN mesager, realizată pe lavaje provenite de la femei cu vârste cuprinse între 17-55 ani a demonstrat că:

- Nivelul expresiei p16INK4a s-a corelat cu severitatea bolii
- Prezența p16INK4a s-a corelat în special cu prezența HPV de risc crescut ( $p=0.044$ ). Există o asociere între expresia p16INK4a în leziunile de risc scăzut și prezența HPV de risc crescut, deși această este departe de a fi o corelație perfectă (confirmată prin

analiza imunocitochimică). Nivelul de expresie al p16INK4a a fost dependent de tipul HPV.

- Deoarece biopsia este o metodă de studiu invazivă și detecția imunohistochimică este restricționată la leziunile care sunt morfologic suspicinate de existența unor leziuni neoplazice cuantificarea expresiei p16INK4a la nivel de ARNm și proteină în lavajele cervicale pot fi biomarkeri utili în detecția leziunilor cu capacitate de transformare.
- p16 INK4a reprezintă un biomarker promițător, deoarece expresia sa reflectă atât prezența HPV oncogen cât și dereglarea funcționării normale a ciclului celular.

### **9. Expresia hTERT ca potențial marker de diagnostic:**

- Numărul cazurilor la care s-a observat expresia hTERT a crescut cu severitatea leziunii intraepiteliale
- HPV a fost prezent în 84% din cazurile analizate, dar numai în 40,48% dintre acestea s-a observat expresia hTERT.
- Asocierea directă între expresia hTERT, prezența HPV de risc crescut, ca și creșterea severității displaziei, sugerează că activarea hTERT poate fi un mecanism central prin care infecțiile HPV conduc la transformarea malignă.
- Analiza expresiei hTERT poate fi utilizată în diagnostic pentru a scădea rezultatele fals-negative în probele citologice dar numai ca adjuvant rezultatele necesitând corelarea cu trăsăturile morfologice.

### **10. Expresia *K-ras* – marker al leziunilor displazice și canceroase:**

- Prezența mutațiilor în 39,5% din cazuri sugerează un posibil rol al *K-ras* în procesul de carcinogeneză, mutațiile în codonul 12, cu activarea oncogenei, putând constitui un prognostic nefavorabil.
- Dacă nivelele de expresiei ale p16INK4a au crescut gradual cu severitatea leziunii, în cazul expresiei ARNm *ras* această situație

nu se respectă, dar expresia *ras* în diferitele grupuri de studiu comparativ cu grupul control a avut semnificație statistică.

- prezența infecțiilor HPV de risc scăzut nu conduce la creșterea expresiei *ras*, aceasta rămânând la nivel bazal; expresia *ras* a fost mai crescută în prezența HPV de risc crescut și în special în infecțiile unice cu HPVhr;

**Analiza corelațiilor între profilele de expresie ale celor trei gene** analizate în leziunile preinvazive și cancere a arătat existența corelațiilor pozitive în grupul HSIL/cancere pentru toate posibilitățile analizate: p16:*ras*, p16:hTERT, *ras*:hTERT.

- prezența expresiei p16 corelată cu prezența hTERT depistează stadiile precoce ale transformării celulare.
- Expresia *ras* corelată cu prezența expresiei hTERT nu permite depistarea sistematică a unei patologii neoplazice în stadii precoce ci doar în stadii avansate de boală.

**Obiectiv 2. - studiul unor markeri de monitorizare a pacienților cu cancere asociaite HPV și implicit de depistare a recidivei**

1. ADN HPV a fost detectat în 78,82% dintre carcinoamele celulare scuamoase cu localizare laringo-faringiană analizate prin metoda nested PCR.
2. Extinderea tumorală nu este influențată de prezența ADN HPV, procentul de cazuri HPV pozitive fiind relativ asemănător în toate grupele (T4- 81,25%; T3- 82,60%; T2- 72,22%; T1- 75%).
3. Simpla analiză histopatologică detectează metastazarea locală în 52,5% din cazuri, corelat cu extinderea tumorală.
4. Detecția ADN HPV în ganglioni (la pacienții care prezintă ADN HPV16 la nivelul tumorii primare) completează decția bolii metastatice (în funcție de care se poate stabili conduita terapeutică).

5. Decelarea ADN HPV în ganglioni poate fi considerată un **marker de diagnostic (stadializare) și de monitorizare a pacienților** din grupele de risc în cadrul neoplaziilor asociate HPV.
6. Prezența ADN HPV în sânge este corelată cu prezența metastazelor locoregionale ceea ce ar putea susține metastazarea pe cale sanguină a cancerelor laringo-faringiene în același timp cu cea ganglionară.
7. Pacienții cu cancere ale căilor respiratorii superioare prezintă defecte imunologice severe.
8. Profilurile citokinelor Th1 și Th2 la pacienți cu cancere în sfera ORL sunt aberante. Neoplaziile analizate conduc la conversia mai mult sau mai puțin generalizată a unui răspuns imun de tip Th1 la unul de tip Th2, considerat inefficient în apărarea anti-tumorală.
9. Compararea între profilul citokinic în plasma pacienților cu cancere ale căilor respiratorii superioare și subiecții control a arătat că pacienții cu cancere ale căilor respiratorii superioare au un nivel crescut de citokine Th2 în timp ce variațiile citokinelor Th1 sunt inconsistente. Rezultatele au arătat o creștere semnificativă în nivelurile citokinelor Th2 (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) comparativ cu lotul control. În dezacord cu schimbarea către profilul citokinic Th2 a fost creșterea nivelurilor IL-2.
10. Pacienții cu tumori laringo-faringiene fără infecție HPV asociată, au un prognostic mult mai sever comparativ cu cei la care s-a decelat prezența ADN HPV, susținut de un profil citokinic puternic inclinat spre TH2.
11. Atunci când s-au analizat doar pacienții HPV pozitivi, s-a observat că prezența ADN HPV în sângele pacienților cu cancere laringo-faringiene a fost asociată cu accentuarea profilului citokinic de tip Th2 ceea ce argumentează ipoteza că celulele decelate sunt celulele epiteliale tumorale cu potențial metastatic.

12. Luând în considerare că această conversie Th1 la Th2 este considerată „primum movens” în dezvoltarea procesului neoplazic, ar trebui schimbată optica asupra strategiilor antitumorale bazate în general pe rezecția chirurgicală a tumorii, cu sau fără radioterapie/ chimioterapie asociată, care în acord cu rezultatele noastre ar trebui să fie însoțită de o terapie de imunomodulare, de prevenire sau de restabilire a dezechilibrelor imunologice apărute.

**Obiectivul 3:** inițierea unei culturi de celule ca **model de studiu al transformării maligne**

1. cultura de celule a fost inițiată dintr-o tumoră de laringe de la un pacient cu metastaze locoregionale și care ulterior a dezvoltat recurențe prin contiguitate și metastaze distale;
2. TV este o linie celulară aderentă în care s-a evidențiat prezența genomului HPV16, dar particulele virale nu au fost observate utilizând microscopia de transmisie.
3. Morfologia este epitelioidă cu rare celulele fibroblastice. Cultura prezintă rată de proliferarea crescută, fapt demonstrat și de procentul mare al markerilor de proliferare și activarea celulară: CD71 -99,95%; HLA-DR - 75.68 %. În plus, prezintă capacitate mare de autoregenerare demonstrată de clonele mari (>200 μm), cu forme neregulate.
4. TV produce în special citokine care susțin fenotipul metastazant (TV secretă IL-6 și IL-8 la niveluri net superioare comparativ cu HeLa - linie celulară de adenocarcinom cervical).
5. Celulele HPV pozitive pot produce citokine care reglează răspunsurile imune inflamatorii. Aceasta susține ipoteza că abilitatea de a forma metastaze în situri secundare este datorată, cel puțin în unele cazuri, caracteristicilor celulelor tumorii primare.