

Teza de doctorat

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

## Cuprins

<b>INTRODUCERE</b>	<b>1</b>
<b>Capitolul 1. ARGUMENTE PRIVIND IMPLICAREA INFECȚIEI HPV ÎN PATOLOGIA UMANĂ</b>	<b>10</b>
<b>Capitolul 2. CARACTERIZAREA GENERALĂ A PAPILOMAVIRUSURILOR</b>	<b>15</b>
2.1 Clasificarea papilomavirusurilor	15
2.2. Proprietățile morfologice și de cultivare ale papilomavirusurilor umane	19
<b>Capitolul 3. REPLICAREA HPV ȘI IMPLICAȚIILE DIFERITELOR PROTEINE VIRALE ÎN ONCOGENEZĂ</b>	<b>21</b>
3.1. Sinteza proteinelor HPV	21
3.2. Relația dintre ciclul de replicare al papilomavirusurilor și oncogeneză	26
<b>Capitolul 4. PATOGENIA INFECȚIEI HPV</b>	<b>32</b>
4.1. Manifestările clinice ale infecției cu HPV	32
4.2. Mecanismele moleculare ale transformării maligne în infecția HPV	34
4.2.1. Implicarea proteinelor E6 în transformare	35
4.2.2. Implicarea proteinelor E7 în transformare	43
4.2.3. Implicarea proteinelor E2 în transformare	49
4.2.4. Implicarea proteinelor E5 în transformare	52
<b>Capitolul 5. EPIDEMIOLOGIA INFECȚIEI HPV ȘI A CANCERELOR ASOCIATE</b>	<b>57</b>
<b>Capitolul 6. CORELAȚIA ÎNTRE ELUDAREA IMUNĂ ȘI ONCOGENITATE ÎN INFECȚIA HPV</b>	<b>68</b>
6.1. Considerații generale privind protecția antitumorală	68
6.2. Rolul inflamației cronice în dezvoltarea cancerului	72
6.3. Mecanismele eludării imune specifice infecției HPV	74
6.3.1. Menținerea infecției la niveluri scăzute	75
6.3.2. Exploatarea redundanței codului genetic	76
6.3.3. Mimarea proteinelor gazdă	76
6.3.4. Modularea prezentării antigenelor tumorale	77
6.3.5. Interferența cu producere de interferon	78
6.3.6. Inhibarea citokinelor și a chemoattractanților	80
6.3.7. Distorsionarea profilului citokinelor	80
6.3.8. Modularea expresiei moleculelor de adeziune	81
6.3.9. Inhibarea migrării celulelor prezentatoare de antigen	82
6.3.10. Prevenirea apoptozei	82
6.4. Relația dintre capacitatea de transformare și evaziunea imună	83
6.4.1. Diferențe între mecanismele de evaziune imună ale HPV de risc crescut și HPV de risc scăzut	83
6.4.2. Diferențe între variantele HPV, capacitatea de transformare și evaziunea imună	84
<b>Capitolul 7. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI HPV ȘI AL CANCERELOR ASOCIATE</b>	<b>85</b>
7.1. Diagnosticul precoce al leziunilor precursoră și cancerului de col uterin	85
7.1.1. Examenul citologic	85

7.1.2. Examenul histologic	88
7.1.3. Detecția ADN HPV și a markerilor moleculari specifici	88
<b>7.2. Diagnosticul infecției HPV la nivelul căilor respiratorii superioare</b>	<b>90</b>
<b>Capitolul 8. PROFILAXIA ȘI TRATAMENTUL ÎN BOLILE ASOCIATE INFECȚIEI HPV</b>	<b>92</b>
8.1. Prevenirea cancerelor ano-genitale	92
8.2. Tratamentul bolilor ano-genitale asociate infecției HPV	99
8.3. Profilaxia și tratamentul cancerelor căilor respiratorii superioare	102
<b>Contribuții originale</b>	
<b>Scopul și obiectivele tezei</b>	<b>106</b>
<b>Capitolul 9. MATERIALE ȘI METODE</b>	<b>107</b>
<b>9.1. Constituirea loturilor de pacienți și metodele de investigare</b>	<b>107</b>
<b>9.2. Depistarea și stadializarea cancerului de col uterin</b>	<b>110</b>
9.2.1. Examenul citologic	110
9.2.2. Inspecția vizuală a cervixului / Colposcopia	111
9.2.3. Examenul anatomo-patologic	113
<b>9.3. Stadializarea clinică a cancerelor laringo-faringiene</b>	<b>115</b>
<b>9.4. Tehnici de izolare și de estimare cantitativă /calitativă a ARN/ADN total</b>	<b>119</b>
9.4.1. Izolarea ADN celular total prin metoda standard	119
9.4.2. Extracția ADN din sângele periferic	120
9.4.3. Izolarea ADN/ARN/proteine utilizând TRIZOL	121
9.4.4. Detecția acizilor nucleici utilizând spectroscopia de absorbție	123
9.4.5. Detecția ADN și ARN cu bromură de etidium (analiza electroforetică în gel de agaroză)	124
<b>9.5. Reacția de amplificare polimerazică</b>	<b>125</b>
9.5.1. Reguli pentru alegerea primerilor	126
9.5.2. Strategii de optimizare a eficienței reacției de PCR	126
9.5.3. Verificarea amplificabilității ADN	127
9.5.4. Condițiile utilizate pentru decelarea HPV utilizând PCR standard	128
9.5.5. Amplificarea ADN HPV utilizând reacția <i>Nested</i> -PCR	129
9.5.6. Detecția și genotiparea HPV utilizând kitul INNO-LiPA	130
<b>9.6. Utilizarea reacției de hibridizare</b>	<b>132</b>
9.6.1. Obținerea sondei HPV	133
9.6.2. Utilizarea Souther Blot pentru confirmare	133
9.6.3. Hibridizarea in situ	135
<b>9.7. Reacția RT-PCR</b>	<b>136</b>
<b>9.8. Evaluarea expresiei markerilor fenotipici celulari utilizând imunohistochimie</b>	<b>140</b>
<b>9.9. Evaluarea expresiei markerilor fenotipici celulari utilizând tehnica citometriei de flux.</b>	<b>143</b>
<b>9.10. Determinarea concentrației de citokine (TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-2, IL4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12) în supernatantele culturilor de celule.</b>	<b>145</b>
<b>9.11. Inițierea culturii de celule din piese bioptice</b>	<b>146</b>
9.11.1. Obținerea și menținerea culturii de celule	146
9.11.2. Colorația SA- $\beta$ -Gal	146
<b>9.12. Metode de decelare a modificărilor genice și de analiză cromozomială</b>	<b>147</b>
9.12.1. Decelarea mutațiilor în gena k-ras prin tehnica MASA	147
9.12.2. Decelarea polimorfismului p53	148
9.12.3. Măsurarea cantității de ADN: Analiza ploidiei în culturi de celule și probe biopsice prin citometrie în flux	149
9.12.4. Analiza cromozomială	151
9.12.4.1. Prepararea cromozomilor	151
9.12.4.2. Bandarea G	152
9.12.4.3. Caracterizarea generală a cromozomilor mitotici umani	153
	155
<b>9.13. Metode de analiză statistică</b>	<b>155</b>
<b>REZULTATE</b>	
<b>Capitolul 10. STABILIREA UNOR MARKERI CELULARI/MOLECULARI ASOCIAȚI TRANSFORMĂRII CU HPV</b>	<b>156</b>
<b>10.1. Depistarea cancerului de col uterin (analiza citologică, colposcopică și histologică)</b>	<b>156</b>
10.1.1. Analiza citologică	157
10.1.2. Observarea colposcopică	163
10.1.3. Examenul histologic	167

10.1.4. Incidența leziunilor displazice severe sau cu severitate scăzută la populația analizată	171
<b>10.2. Screening-ul virusologic molecular</b>	<b>173</b>
<b>10.3. Mutageneza inserțională prin integrarea genomului HPV - factor major în promovarea patogenezei cancerelor asociate HPV.</b>	<b>182</b>
10.3.1. Distribuția infecțiilor HPV16	183
10.3.2. Decelarea integrării HPV16 prin PCR multiplex	184
<b>10.4. p16INK4a marker în screening-ul persistenței HPV?</b>	<b>187</b>
10.4.1. Decelarea imunohistochimică a p16INK4a și relația cu gradul CIN	188
10.4.2. Evaluarea modificărilor cantitative ale expresiei genei p16INK4a în dezvoltarea cancerelor cervicale scuamoase HPV induse.	197
<b>10.5. Expresia hTERT ca potențial marker de diagnostic</b>	<b>201</b>
<b>10.6. Expresia k-ras - marker al leziunilor displazice și canceroase</b>	<b>207</b>
10.6.1. Investigarea incidenței mutațiilor punctiforme ale genei K-ras în cancere asociate infecției HPV	209
10.6.2. Evaluarea modificărilor cantitative ale expresiei genei k-ras în dezvoltarea cancerelor cervicale scuamoase HPV induse.	212
<b>10.7. Corelațiile între profilele de expresie ale celor trei gene analizate în leziunile preinvasive și cancere (integrarea rezultatelor)</b>	<b>216</b>
<b>Capitolul 11. POTENȚIALI MARKERI DE MONITORIZARE ÎN CANCERELE LARINGO-FARINGIENE</b>	<b>220</b>
<b>11.1. Depistarea cancerelor cu localizare laringo-faringiană</b>	<b>220</b>
11.1.1. Evaluarea clinică a pacienților	220
11.1.2. Evidențierea histologică a tumorii primare	222
<b>11.2. Decelarea ADN/HPV în cancerele laringo-faringiene:</b>	<b>226</b>
<b>11.3. Virusul HPV-marker în adenopatii metastatice satelite cancerelor laringo-faringiene</b>	<b>234</b>
11.3.1. Evidențierea histologică a adenopatiilor metastatice la pacienți cu cancere cu localizare laringo-faringiană	236
11.3.2. Detecția ADN HPV în adenopatiile metastatice satelite cancerelor laringo-faringiene.	240
<b>11.4. Detecția ADN HPV în circulația periferică la pacienți cu cancere laringo-faringiene.</b>	<b>243</b>
<b>11.5. Expresia citokinelor Th1/Th2 la pacienți cu cancere ale căilor respiratorii. Argumente pentru creșterea aberațiilor expresiei de citokine în stadiile avansate</b>	<b>244</b>
<b>Capitolul 12. TV - MODEL DE STUDIU IN VITRO AL INFECȚIEI CU HPV</b>	<b>264</b>
<b>12.1. Inițierea culturii de celule</b>	<b>264</b>
<b>12.2. Detecția ADN HPV în cultura TV</b>	<b>266</b>
<b>12.3. Caracteristicile morfologice ale culturii TV</b>	<b>266</b>
<b>12.4. Analiza caracteristicilor de proliferare</b>	<b>269</b>
<b>12.5. Analiza citogenetică</b>	<b>272</b>
<b>12.6. Analiza conținutului de ADN</b>	<b>274</b>
<b>12.7. Creșterea clonogenică:</b>	<b>276</b>
<b>12.8. Studiul unor markeri specifici diseminării tumorale</b>	<b>277</b>
12.8.1. Determinarea concentrației de citokine în supernatantul de cultură	277
12.8.2. Expresia receptorului factorului de creștere epidermal (EGFR)	280
12.8.3. Expresia factorului de creștere al epitelului vascular (VEGF)	281
<b>DISCUȚII</b>	<b>284</b>
<b>CONCLUZII FINALE</b>	<b>334</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>340</b>
<b>ABREVIERII</b>	<b>368</b>
<b>COMUNICĂRI ȘI PUBLICAȚII ÎN CADRUL TEZEI</b>	<b>372</b>