

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II – MORFOLOGIE
MICROSCOPICĂ/HISTOLOGIE

ADELMANN ST. TIBERIU GABRIEL



TEZĂ DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA DE NOI ȚINTE MOLECULARE
PENTRU TERAPIA BOLNAVILOR CU TUMORI
VEZICALE INFILTRATIVE

REZUMAT

Conducător științific
PROF. UNIV. DR. MARIUS RAICA

Timișoara
2024

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Abbreviations	VII
Lista tabelelor	VIII
Lista figurilor	IX
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE	XV

PARTEA GENERALĂ

1. Dezvoltarea și histologia vezicii urinare	1
2. Epidemiologia tumorilor vezicale	6
3. Carcinoame uroteliale	12
4. Profilul molecular al tumorilor vezicale infiltrative	21
5. Tratamentul actual al tumorilor vezicale	24

PARTEA ORIGINALĂ

1. Motivație și obiective	27
2. Material și metodă	29
3. Resultate	33
3.1. Particularitățile morfologice ale tumorilor vezicale infiltrative	33
3.1.1. Introducere	33
3.1.2. Resultate	34
3.1.3. Discuții	39
3.1.4. Concluzii	40
3.2. Expresia HER2	41
3.2.1. Introducere	41
3.2.2. Resultate	42
3.2.3. Discuții	45
3.2.4. Concluzii	50
3.3. EGFR ca țintă terapeutică	51
3.3.1. Introducere	51
3.3.2. Evaluarea expresiei EGFR	52
3.3.3. Resultate	53
3.3.4. Discuții	57
3.3.5. Concluzii	60

3.4. VEGF și receptorii specifici, corelația cu microdensitatea vasculară.....	60
3.4.1. Introducere	60
3.4.2. Metodologie	62
3.4.3. Resultate	63
3.4.4. Discuții	69
3.4.5. Concluzii	71
3.5 Proliferarea celulelor endoteliale comparată cu proliferarea celulelor tumorale	72
3.5.1. Introducere	72
3.5.2. Rezultate	74
3.5.3. Discuții	78
3.5.4. Concluzii	81
3.6. Expresia D2-40 și corelația cu axa VEGF-C / VEGFR3	82
3.6.1. Introducere	82
3.6.2. Resultate	84
3.6.3. Discuții	90
3.6.4. Concluzii	93
3.7. Proliferarea celulelor endoteliale limfatice	93
3.7.1. Introducere	93
3.7.2. Probleme tehnice	95
3.7.3. Resultate	96
3.7.4. Discuții	100
3.7.5. Concluzii	102
3.8. CLIC1 este supraexprimat în tumorile vezicale infiltrative	102
3.8.1. Introducere	102
3.8.2. Caracteristici Metodologice	104
3.8.3. Resultate	105
3.8.4. Discuții	111
3.8.5. Concluzii	113
CONCLUZII FINALE	114
BIBLIOGRAFIE	117
ANEXE	I

INTRODUCERE

Patologia oncologică reprezintă în perioada actuală o provocare: cu toate că în ultimele decade fost făcute progrese în diagnosticul precoce și identificarea unor markeri de mare specificitate diagnostică incidența cazurilor noi continuă să crească. În ultimii ani în țările avansate economic, rata deceselor prin cancer a depășit bolile cardiovasculare iar supraviețuirea pe termen lung a bolnavilor cu diferite forme de cancer continuă să fie redusă în ciuda achizițiilor moderne ale terapiei adjuvante. În ultimele două decade în cercetarea oncologică se insistă asupra identificării unor noi ținte terapeutice. Au fost introduse deja în practică o serie de substanțe antitumorale cu efecte demonstrate in vitro și in vivo, deocamdată în combinație cu terapia convențională. Rezultatele în timp sunt dificil de apreciat în acest moment, mai ales că unele s-au demonstrat eficiente în laborator însă au doar efecte discutabile în clinică.

Dacă pentru foarte mult timp cercetările din oncologie s-au axat aproape exclusiv asupra celulelor tumorale și prea puțin asupra micromediului în care acestea proliferază, în perioada actuală constatăm și o modificare semnificativă de concepție în oncogeneză. În prezent, cercetările iau în considerare și micromediul tumoral, a cărui reacție stimulează sau inhibă creșterea celulelor maligne. Au fost descoperiți și caracterizați numeroși factori de creștere, care guvernează nu numai proliferarea celulelor normale, ci și pe cele tumorale. De aceea considerăm că este necesară în primul rând caracterizarea atentă a țințelor moleculare care pot avea impact terapeutic. Din aceste motive ne-am axat studiul asupra celor două componente – celulele tumorale și stroma, încercând să caracterizăm și să validăm ținte moleculare cunoscute, dar și să identificăm noi epitopi care ar putea influența semnificativ strategiile terapeutice actuale.

Această cercetare s-a axat pe identificarea și validarea prin studiu retrospectiv a unor potențiale ținte terapeutice identificate în celulele tumorale sau/și în stroma tumorală, așa cum sunt vasele sanguine și limfatice.

În Partea generală a lucrării am trecut în revistă structura histologică normală a vezicii urinare, apoi cea a tumorilor vezicale maligne, urmate de un scurt excurs în epidemiologia acestora, cu enumerarea factorilor de risc cunoscuți până în prezent. Am insistat asupra heterogenității tumorilor maligne ale vezicii urinare; tipurile histologice ale carcinomului urotelial (numit în trecut „cu celule tranziționale”) sunt trecute în revistă din punct de vedere al istoriei lor naturale și al clasificării histologice. Stadializarea TNM a tumorilor vezicale este prezentată în contextul metodelor de diagnostic și al evaluării clinice.

Am scris un mic subcapitol referitor la profilul molecular al tumorilor vezicale infiltrative, cu atenționare specială asupra relativei rarități a studiilor moleculare asupra tumorilor vezicale infiltrative în musculară, în majoritatea lor acestea fiind realizate după modelul tumorilor maligne cu alte localizări ale bolii neoplazice (de ex. cancerul mamar). Tipurile moleculare definite în prezent sunt incomplet caracterizate, iar în carcinomul urotelial performanțele biologiei moleculare încă nu rivalizează cu rezultatele obținute în cancerul mamar.

Deși aparent complicată și costisitoare, clasificarea moleculară a născut noi strategii terapeutice aflate în prezent în stadiul de testare.

Lucrarea de față se circumscrie acestui start favorabil și încurajator în care identificarea de noi strategii și ținte terapeutice apare ca o necesitate pentru noi cercetări și noi interpretări ale unor observații mai vechi.

Partea originală prezintă, la început, motivația și obiectivele studiului, urmate de prezentarea materialului și a metodelor.

Ne-am propus constituirea unui lot omogen de pacienți cu tumori vezicale infiltrative și studierea unor posibile noi ținte moleculare pentru terapia adjuvantă. Pentru unii dintre acești markeri biologici – cu potențial impact asupra strategiei terapeutice - nu am găsit

referințe în literatura de specialitate, așa încât apreciem că lucrarea are un *caracter de noutate*.

Obiectivele studiului au fost următoarele:

- Investigarea particularităților morfologice ale cazurilor incluse în studiu și stabilirea parametrilor clinicopatologici convenționali.
- Evaluarea expresiei HER2 și stabilirea proporției reale a cazurilor care pot răspunde la terapia cu trastuzumab.
- Investigarea impactului EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) asupra progresiei și terapiei bolii, ca potențială țintă pentru inhibitorii specifici.
- Studiul micromediului tumoral prin evaluarea extensivă a angiogenezei, având în vedere densitatea microvasculară, proliferarea celulelor endoteliale, expresia VEGF (Vascular endothelial growth factor) și a receptorilor specifici, VEGFR1 și VEGFR2.
- Analiza fenomenului de limfangiogeneza, având în vedere frecvența metastazelor limfonodale la aceste cazuri. Chiar dacă în prezent pentru acest aspect nu există ținte clar definite și nici medicație acceptată pentru terapia cancerelor umane, considerăm că această modalitate de abordare poate aduce date în plus pentru completarea profilului tumorilor vezicale infiltrative.
- Studiul expresiei și semnificației proteinei CLIC1 (proteina canalelor pentru clorid) în celulele tumorale și netumorale ale vezicii urinare; nu am găsit date referitoare la acest subiect în literatura de specialitate. Această moleculă poate deveni o țintă terapeutică atractivă, netestată până în prezent pentru tumorile vezicale infiltrative.

MATERIAL ȘI METODE

Pacienți. Studiul retrospectiv a investigat 52 de cazuri consecutive de tumori vezicale infiltrative (T2-T4), tratate în Spitalul Municipal Arad între anii 2010 și 2015. Diagnosticul a fost stabilit pe baza procedurilor standardizate. Toți pacienții au fost supuși procedurii chirurgicale de cistectomie radicală, continuată de efectuarea rezervorului de substituție. Elementele de includere în studiu au fost reprezentate de existența documentată a tumorii infiltrative, date complete asupra bilanțului de extensie și stadializarea TNM. Specimenele pentru studiul de față au fost prelevate numai din piesa de cistectomie radicală, selecționându-se un fragment reprezentativ din tumoră și un fragment de la interfața tumoră – perete vezical macroscopic fără modificări semnificative.

Prelucrarea primară a fost efectuată în sistem automat standardizat cu stația de lucru Thermo Shandon. Din fiecare bloc la parafină au fost efectuate secțiuni seriate multiple, adaptate colorațiilor morfologice și imunohistochimice.

Evaluarea morfologică s-a efectuat pe secțiunile colorate cu metoda hematoxilină-eozină, tehnica standard, cu sistem automat Leica, stabilind tipul histopatologic de carcinom, gradul de diferențiere și nivelul invaziei; în plus, a fost raportată invazia limfovasculară.

Metoda imunohistochimică s-a efectuat în procedură complet automatizată și standardizată pentru toate cazurile, cu automatul pentru imunohistochimie Leica Bond-Max. Secțiunile au fost tratate cu anticorpii primari iar pentru vizualizare am utilizat sistemul sistemul Bond Polymer Refine Detection System. Produsul final de reacție a fost vizualizat cu 3, 3-diamino-benzidină dihidroclorid (10 minute) și nucleii au fost colorați cu hematoxilină Lillie modificată. Secțiunile colorate au fost montate în mediu permanent cu balsam de Canada.

Metodele imunohistochimice combinate (dublă imunocolorare) pe care le-am efectuat în cercetarea de față au fost următoarele:

CD34/Ki67 pentru identificarea caracterului proliferativ al celulelor endoteliale ale vaselor sanguine, CD34 cu expresie citoplasmatică evidențiat cu Fast Red (roșu) și Ki67 (evidențiat cu diaminobenzidină, DAB (în brun).

D2-40/Ki67 pentru identificarea caracterului proliferativ al celulelor endoteliale ale vaselor limfatice, D2-40 cu expresie citoplasmatică evidențiat cu Fast Red (roșu) și Ki67 (evidențiat cu diaminobenzidină, DAB (în brun). Au fost luate în considerare doar celulele care au prezentat co-expresia celor doi markeri.

Evaluarea microscopică și analiza imaginii s-a efectuat cu microscopul Zeiss Axiocam 506 și Nikon AY260, ambele dotate cu sistem de preluare a imaginii în timp real și cu soft pentru analiza imaginii microscopice digitale. Calcularea densității microvasculare s-a efectuat după metoda standard (*Weidner, 1993; Gasparini et al, 1993*). Aceași metodă a fost aplicată pe secțiunile colorate cu CD34 și D2-40. Ki67 a fost evaluat prin metoda semiautomată originală (*Suciu și colab., 2014*), pe secțiunile cu dublă imunocolorare. HER2 (Herceptest) și EGFR au fost estimate pe baza scorurilor acceptate internațional. Epitopii cu expresie citoplasmatică (factorii de creștere) au fost exprimați prin punctaj, aplicând scorul de la 0 la 3 (0, negativ, 1 sub 25% celule pozitive, 2 25-50% celule pozitive, 3 peste 50% celule pozitive).

Metodele statistice. Analiza statistică a cazurilor a vizat preferențial evaluarea corelației dintre markerii investigați și parametri clinico-patologici convenționali. În acest sens au fost aplicate testele Student și chi pătrat, $p < 0.5$ fiind considerat ca semnificativ statistic. Nu am analizat datele referitoare la supraviețuire datorită lotului relativ mic pentru astfel de studii.

Rezultatele pe care le-am obținut le-am structurat în opt capitole (3.3.1 – 3.3.8) în concordanță cu obiectivele studiului. Ele au la bază observațiile microscopice asupra secțiunilor colorate cu metodele morfologice și imunohistochimice, corelate cu parametri clinico-patologici și le confirmăm ca originale. Studiul a avut doar componentă retrospectivă. Selecția inițială a cazurilor a avut în vedere prezența unui specimen reprezentativ din tumora primară, compatibil cu determinarea elementelor T și G; din punct de vedere tehnic, cinci cazuri au fost excluse. În aceste condiții, rezultatele prezentate în continuare se bazează pe analiza a 47 de cazuri.

3.3.1. Particularitățile morfologice ale tumorilor vezicale infiltrative

În acest capitol am prezentat rezultatele obținute pe secțiunile colorate cu metoda uzuală.

Din analiza cazurilor incluse în studiu am constatat că majoritatea au fost carcinoame uroteliale, și doar câteva carcinoame scuamocelulare și adenocarcinoame.

Faptul că majoritatea tumorilor incluse în studiu au fost carcinoame cu diferențiere mai mult sau mai puțin evidentă urotelială a condus la realizarea unui lot omogen de cazuri, pe care considerăm că pot fi trase concluzii reprezentative. Am avut un număr mic de pacienți cu carcinom scuamocelular și adenocarcinom, astfel încât am considerat rezultatele asupra lor ca fiind orientative, impunând studii ulterioare.

Incidența cazurilor cu grad 3 de diferențiere a fost mai mare decât datele din literatura de specialitate, deși au provenit de la pacienți consecutiv. Am pus acest aspect pe seama stadiului avansat de evoluție naturală a bolii și diagnostic tardiv prin prezentarea tardivă la medic

Leziunile asociate, de tipul displaziei și carcinomului in situ au fost observate la un număr relativ mic de cazuri prin comparație cu datele din literatură. O explicație a acestui fapt poate fi prelevarea unui număr redus de fragmente din zona limitrofă tumorii, chiar dacă toate cazurile au fost tratate chirurgical prin cistectomie radicală. Scopul lucrării noastre, însă, a fost acela de a identifica ținte terapeutice la nivelul tumorii primare propriu-zise.

Formele particulare de carcinom urotelial, așa cum sunt carcinomul cu celule clare și cel sarcomatoid, au caractere morfologice distincte, dar prin prisma actualelor strategii terapeutice sunt tratate prin aceleași proceduri ca și carcinoamele uroteliale clasice, deși ambele sunt caracterizate prin marcată agresivitate și molecular au profil diferit.

În concluzie, studiul morfologic al cazuisticii selecționată pentru studiul de față relevă predominanța carcinomului urotelial. Majoritatea cazurilor au prezentat invazie profundă în musculară și au fost slab diferențiate. Formele particulare de carcinom urotelial au fost dezvoltate cu celule clare și sarcomatoide. Carcinoamele scuamocelulare și adenocarcinoamele sunt minoritare, dar sunt caracterizate prin parametri clinico-patologici de mare agresivitate.

3.3.2. Expresia HER2

HER2 este receptorul pentru factorul de creștere epidermal 2, cunoscut în oncologie prin supraexpresia sa în subtipul molecular omonim de cancer mamar. Supraexpresia HER2 induce proliferarea, creșterea și supraviețuirea celulară - în particular a celulelor tumorale, fiind slab exprimată în majoritatea țesuturilor normale

Introducerea în practica terapeutică a trastuzumabului (anticorp monoclonal umanizat), una dintre primele medicații care se adresează unei ținte moleculare specifice, a reprezentat un progres real în terapia oncologică.

Supraexpresia HER2 în carcinoamele uroteliale a fost raportată în urmă cu peste 15 ani; totuși, în prezent, nu există o strategie acceptată pentru terapia cu trastuzumab.

Având în vedere potențialul impact terapeutic, în capitolul de față am investigat supraexpresia HER2 pe un lot omogen de tumori vezicale infiltrative doar prin metoda imunohistochimică; deoarece trastuzumabul acționează doar asupra celulelor tumorale care supraexprimă HER2 la nivel membranar, nu am efectuat hibridizare in situ.

Rezultate

Pe secțiunile examinate uroteliul normal morfologic - dar nici celelalte structuri tisulare! - nu a exprimat HER2. Singurele elemente pozitive au fost celulele tumorale ceea ce semnalează specificitatea mare a acestei reacții.

Din totalul de 45 de cazuri incluse în această parte a studiului, 12 au fost pozitive adică 26.66%, corelând statistic semnificativ cu gradul de diferențiere (toate au fost G3). Carcinoamele uroteliale sarcomatoide, cele scuamocelulare și cele cu celule clare au fost negative. De asemenea, observațiile noastre confirmă caracterul heterogen al supraexpresiei HER2, arii întinse de plaje tumorale pozitive alternând cu cele negative.

Supraexpresia HER2 în carcinomul urotelial al vezicii urinare se corelează cu agresivitatea tumorii și are rol predictiv asupra recurenței.

Concluzii

Observațiile noastre asupra supraexpresiei HER2 la nivel proteic semnalează imunoreacție pozitivă (+2 și +3) la 26.66% dintre cazuri și atrage atenția asupra unui subgrup de pacienți cu tumori vezicale infiltrative care pot beneficia de terapia cu trastuzumab, asociată chimioterapiei convenționale. Considerăm că rezultatele noastre, deși obținute pe un număr relativ mic de cazuri aduc argumente majore pentru introducerea terapiei cu trastuzumab sau droguri similare la anumite cazuri de tumori vezicale invazive în musculara proprie, dar numai după testare prealabilă imunohistochimică.

3.3.3. EGFR ca țintă terapeutică

EGFR (receptorul pentru factorul de creștere epidermal 1, cunoscut și ca HER1), aparține tot familiei de receptori tirozinkinazici. Activarea EGFR stimulează proliferarea și supraviețuirea celulară și inhibă sau limitează apoptoza (*Memon et al, 2011*). Expresia aberantă a EGFR în variate forme de cancer (inclusiv în tumorile vezicale), prin comparație cu țesuturile normale se corelează cu prognosticul nefavorabil (*Garcia et al, 2003*). Deși există mai multe studii asupra expresiei EGFR în tumorile vezicale, semnificația sa clinică este încă incertă.

Există inhibitori activi ai EGFR, introduși deja în practica medicală (iressa sau gefitinib), însă se pare că asocierea lor cu terapia convențională nu ameliorează semnificativ evoluția. Lipsa dovezilor clare exclude în prezent inhibitorii EGFR din terapie. Datele controversate prezentate ne-au determinat să abordăm cercetarea expresiei EGFR în studiul de față.

Rezultate

Am evaluat expresia imunohistochimică a EGFR printr-o modalitate proprie de scorificare, pe care o redăm în tabelul următor:

Punctaj	Procentaj de celule pozitive	Intensitatea reacției
0	0	-
+1	Sub 10%	Slabă
+2	10-30%	Moderată
+3	Peste 30%	Intensă

Uroteliul normal din vecinătatea tumorii a fost pozitiv pentru EGFR pe toată înălțimea sa.

Carcinoamele uroteliale invazive au prezentat reacție pozitivă distribuită după trei modele: - citoplasmatic intens (considerată de unii autori nespecifică; noi considerăm că intensificarea membranară este pur și simplu mascată de intensitatea mare a produsului final de reacție);

- citoplasmatic cu intensificare membranară;
- doar membranar;

Am obținut un procentaj mai mare de cazuri pozitive (82.22%) decât la alți autori. De asemenea, am observat o corelație semnificativă între expresia EGFR și gradul de diferențiere tumorală, reacția fiind intens pozitivă în toate ariile slab diferențiate.

Interesantă este și relația EGFR cu supraexpresia HER2, în studiul nostru aparând trei grupe de pacienți, respectiv, care exprimă doar EGFR (n=24), coexprimă EGFR și HER2 (n=13), și al treilea, care exprimă doar HER2 (n=1).

În concluzie, am identificat expresia EGFR în celulele tumorale la 82.22% dintre tumorile vezicale invazive incluse în studiu. Am imaginat și pus în aplicare în studiul de față un sistem nou de scorificare a imunoreacției pentru EGFR. Au fost pozitive majoritatea carcinoamelor uroteliale (inclusiv formele microscopice particulare), și carcinoamele scuamocelulare, și au fost negative adenocarcinoamele și tumorile uroteliale bine diferențiate. Pe baza comparației cu supraexpresia HER2 am identificat trei subgrupe diferite de bolnavi (EGFR+/HER2-, EGFR+/HER2+ și EGFR-/HER2+), care pot beneficia de terapie țintită specifică și diferențiată.

3.3.4. Factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF) și corelația cu microdensitatea vasculară

În acest capitol am abordat studiul densității microvasculare (MVD) în corelație cu expresia factorului de creștere a endoteliului vascular (VEGF) și a receptorilor specifici, dintre care am selecționat VEGFR2, considerat de mulți autori ca potențială țintă terapeutică. MVD aduce informații asupra progresiei locale și a dezvoltării metastazelor pe cale hematogenă. În majoritatea studiilor publicate până în prezent, MVD cu valori crescute este considerat element de prognostic nefavorabil, corelându-se cu stadiul avansat al tumorii, grad crescut de malignitate, progresie locală rapidă și metastazare. Pe de altă parte, valorile MVD nu informează asupra răspunsului potențial al tumorii la terapia antivasculară, iar relația cu factorii de creștere și în special cu VEGF este încă incertă (*Raica et al, 2010*).

VEGF este un factor de creștere, fiind cea mai puternică substanță angiogenică cunoscută în prezent. VEGF este secretat de o mare varietate de celule normale, dar este supraexprimat în celulele tumorale, în particular în condiții de hipoxie generate de proliferarea rapidă. VEGF stimulează in vitro și in vivo proliferarea, diferențierea,

supraviețuirea și migrația celulelor endoteliale, atât în condiții normale, cât și tumorale. Este posibil însă ca VEGF să nu fie singurul factor de creștere implicat în formarea de noi vase sanguine. VEGF devine activ după legarea la receptorii specifici exprimați de celulele endoteliale, dintre care cel mai eficient este VEGFR2. Deși VEGFR2 este intens exprimat de către vasele sanguine asociate carcinomului urotelial, nu s-a putut demonstra până în prezent un efect antitumoral semnificativ prin tratamentul cu inhibitori specifici (*Li et al, 2015*).

Considerăm că pe baza datelor existente, ipoteza studiului de față se raportează la efectul multiplilor factori de creștere care cooperează în stimularea inițierii și progresiei tumorale, în cascadă, ceea ce ar justifica lipsa de corelație dintre expresia VEGF, VEGFR2 și valorile MVD. Scopul acestui studiu a fost acela de a identifica țintele vasculare și tumorale pentru terapia antivasculară și respectiv, antiangiogenică. Rezultatele noastre sugerează introducerea unui protocol standardizat pentru profilul molecular al carcinomului urotelial invaziv. Această metodologie ar putea fi utilă în rafinarea terapiei personalizate și creșterea eficienței terapiilor biologice.

Pe baza rezultatelor obținute, considerăm că VEGF nu reprezintă o țintă terapeutică în tumorile vezicale infiltrative. Expresia VEGF nu se corelează cu parametri clinicopatologici ai tumorii și nu reprezintă un element de prognostic individual sau predictiv pentru răspunsul la terapie.

Invasia vaselor sanguine de către celulele tumorale se decelează optim pe preparate colorate pentru CD34. Având în vedere importanța clinică a acestui parametru, aplicarea metodei în carcinoamele uroteliale infiltrative devine obligatorie.

Microdensitatea vasculară reprezintă un parametru prognostic util, se corelează cu invazia vasculară și cu gradul de diferențiere, dar nu recomandăm aplicarea sa constantă la toate cazurile. Vasele imature și intermediare reprezintă o țintă atractivă pentru terapia antivasculară și pot reprezenta elemente orientative pentru evaluarea răspunsului la terapie specifică.

3.3.5. Proliferarea celulelor endoteliale comparată cu proliferarea celulelor tumorale și tipul de vase asociate tumorii

Vasele sanguine din stroma tumorilor maligne sunt diferite morfologic de cele normale sub aspectul mărimii, traiectului, grosimii peretelui și al absenței lumenului. Încă din 2003 *Gee și colab* au clasificat vasele sanguine asociate tumorii în imature, intermediare și mature. Deși aplicată în câteva studii cu rezultate promițătoare, această clasificare este rareori luată în discuție în cadrul diagnosticului patologic de rutină (probabil pentru că nu toate vasele răspund la această modelitate terapeutică).

Am investigat acest aspect pe cazurile incluse în studiu, în speranța găsirii țintei optime pentru medicația antivasculară. Aceasta constituie un element de noutate al tezei, intru-cât, până în prezent însă nu există nicio publicație referitoare la tumorile vezicale infiltrative din acest punct de vedere.

Celulele endoteliale dormante au durată lungă de viață, cu o rată extrem de scăzută de diviziune. În țesuturile normale timpul de dublare a populației celulare endoteliale este de peste 1000 de zile, dar devine de doar câteva zile dacă celulele sunt activate – proces semnalat de expresia precoce a endoglinei (*Ceausu și colab., 2011; Ferician și colab., 2017*).

Ipoteza de lucru are două scopuri: reliefează valoarea prognostică a proliferării endoteliale și demonstrează valoarea de potențial indicator al răspunsului la terapia antiangiogenică și antivasculară.

Rezultate

Tipurile de vase asociate tumorii vezicale infiltrative au fost evaluate prin metoda de dubla colorare imunohistochimică, bazată pe un marker endotelial citoplasmatic (CD31, produs final de reacție vizualizat în brun) și un marker specific pentru filamentele contractile găsite în celulele perivasculare (actina de tip muschi neted, produs final de reacție colorat în roșu). Pentru vasele imature și intermediare a fost evident doar markerul endotelial.

La toate tumorile vezicale infiltrative studiate am identificat toate cele trei tipuri de vase asociate tumorii. Am remarcat că vasele imature sunt mai numeroase în aria tumorală în zona centrală, unde reprezintă 62.25% dintre toate structurile pozitive pentru markerul endotelial, în timp ce vasele intermediare reprezintă 35.1%, iar vasele mature doar 6.65%.

Raportul dintre tipurile de vase se modifică în aria tumorală zona periferică, unde cresc vasele intermediare, până la 54% și a celor mature, până la 18.6%. În zona peritumorală practic nu am observat vase imature.

Cuantificarea proliferării endoteliale pe dubla imunoreacție pentru CD31 și Ki67 este problematică, deoarece în tumorile vezicale infiltrative un mare număr de celule maligne sunt de asemenea pozitive la nivel nuclear. Noi am luat în considerare doar celulele care exprima Ki67 la nivel nuclear și coexprima în roșu actina de tip muschi neted la nivel citoplasmatic. Semnalăm prezența nucleilor de celule endoteliale colorați pentru Ki67 doar pentru vasele imature și intermediare, și niciodată pentru cele mature.

Concluzii

În capitolul de față am demonstrat pentru prima dată existența vaselor imature și intermediare în tumorile vezicale infiltrative. Vasele imature predomină intratumoral, iar cele intermediare intratumoral periferic și peritumoral. Doar aceste două tipuri de vase pot reprezenta o țintă terapeutică viabilă pentru medicația antivasculară. Densitatea microvasculară calculată doar pentru vasele imature și intermediare are mare valoare prognostică. Rata de proliferare a celulelor endoteliale reflectă cu acuratețe activarea și progresia angiogenezei tumorale și poate fi un candidat major la evaluarea eficienței terapiei antivasculară și antiangiogenice.

3.3.6. Expresia și semnificația podoplaninei D2-40 în cancerul vezical

Formarea de noi vase limfatice se numește limfangieneză și este frecvent asociată evoluției naturale a carcinoamelor. Pentru mult timp vasele limfatice și formarea lor în condiții normale și patologice a fost neglijată, în special prin lipsa unor markeri specifici endoteliului limfatic. Identificarea podoplaninei ca marker de mare specificitate pentru celulele endoteliale limfatice (LEC) a permis studiul densității vaselor limfatice (LVs) independent de vasele sanguine. În prezent în majoritatea cercetărilor este utilizat anticorpul D2-40, care recunoaște epitopul formalin-insensibil al podoplaninei exprimat de LEC, dar nu colorează endoteliul vaselor sanguine. Prin această metodă poate fi calculată densitatea microvaselor limfatice (LMVD) și este mult mai ușor identificată invazia limfovasculară (*Raica și colab., 2013; Raica și colab., 2015; Cobec și colab., 2016*). Primul scop al acestei părți a studiului a fost acela de a demonstra corelația dintre LMVD și parametri clinico-patologici de prognostic.

Spre deosebire de angieneză, în limfangieneză nu există în prezent inhibitori acceptați pentru aplicarea în terapia oncologică umană. Există în prezent doar studii experimentale care au aplicat anticoprii monoclonali anti-podoplanină (NZ-1) și anti-VEGF-C în model animal, dar rezultatele sunt neconvingătoare. Din aceste motive, considerăm că este obligatorie caracterizarea cu acuratețe a țintelor terapeutice, așa cum am abordat-o în continuare pentru tumorile vezicale.

Primul scop al studiului de față a fost validarea metodei și testarea sensibilității și specificității anticorpului D2-40 pentru endoteliul vaselor limfatice. În termenii specificității față de endoteliul vaselor sanguine, imunoreacția cu D2-40 a fost pozitivă doar în endoteliul limfatic. La toate structurile cu lumen și caracteristici morfologice de vase sanguine reacția a fost negativă.

Reacția pentru podoplanină a fost pozitivă la nivelul endoteliului vaselor limfatice la toate cazurile incluse în studiu. Metoda are pe de o parte mare sensibilitate pentru endoteliul limfatic, deoarece constant nu colorează celulele endoteliale ale vaselor sanguine.

Vasele limfatice au fost prezente atât în aria intratumorală, cât și în aria peritumorală, iar numărul de vase limfatice este mai mare în aria peritumorală decât în cea intratumorală, excepție făcând doar două cazuri de carcinom urotelial invaziv.

Desigur, rezultatele sunt extrapolabile pentru carcinoamele uroteliale, cu număr reprezentativ de cazuri, dar nu putem face afirmații definite asupra celorlalte forme histopatologice din acest punct de vedere.

În majoritatea tumorilor studiate, respectiv 43 dintre cele 50 de cazuri, în stroma tumorii au fost prezente în număr mare celule intens colorate cu anti-podoplanină, dispuse în imediata vecinătate a placardelor de celule tumorale, cu morfologie caracteristică miofibroblastelor.

Expresia podoplaninei în celulele tumorale este un alt aspect care a fost observat la 8 dintre cele 47 de carcinoame invazive uroteliale, inclusiv formele cu celule clare, la ambele cazuri de carcinom scuamocelular, și a fost negativă în forma sarcomatoidă și adenocarcinom. Am găsit corelație statistică semnificativă, direct proporțională, între expresia podoplaninei în celulele tumorale și gradul de diferențiere. De remarcat faptul că expresia podoplaninei în celule proliferative este o achiziție timpurie în timpul carcinogenezei, deoarece am găsit celule pozitive în metaplazia scuamoasă a uroteliului și în uroteliul displazic.

Invazia limfovasculară este un element deosebit de important pentru raportarea patologică, pentru că se corelează statistic semnificativ cu riscul de metastaze limfonodale la un număr foarte mare de cazuri. Invazia limfovasculară este relativ ușor de detectat pe secțiunile colorate cu D2-40, metodă pe care o recomandăm de rutină pentru evaluarea acestui parametru..

Observațiile noastre relevă identificarea vaselor limfatice la toate cazurile incluse în studiu. Am remarcat invazie limfovasculară cu densitate mai mare în vasele peritumorale decât în cele intratumorale. Considerăm că imunoreacția pentru podoplanină este deosebit de eficientă pentru diagnosticul invaziei limfovasculare. LMVD se corelează cu stadiul tumorii și gradul de diferențiere pentru carcinoamele de tip urotelial. Podoplanina este exprimată de către celulele tumorale la 17.02% dintre cazuri, fiind astfel o atractivă țintă terapeutică. Rezultatele noastre susțin testarea expresiei podoplaninei în tumorile vezicale infiltrative, având în vedere că există trei ținte terapeutice potențiale: miofibroblaste, endoteliul vaselor limfatice și selectiv, celulele tumorale.

3.3.7. Proliferarea celulelor endoteliale limfatice și expresia Prox-1

În acest capitol ne-am propus caracterizarea vaselor limfatice din aria tumorală și peritumorală, elucidarea valorii prognostice a densității microvasculare limfatice (LMVD), studierea incidenței invaziei limfovasculare și caracterizarea expresiei markerilor LECs în celulele tumorale.

Datele actuale asupra limfangiogenezei arată că formarea de noi LVs are la bază transdiferențierea celulelor din venulele postcapilare, care ulterior pierde conexiunea cu sistemul venos. Acest proces este inițiat sub acțiunea Prox-1, se pare cel mai bun indicator al celulelor programate să devină LEC. În prezent nu sunt cunoscuți inhibitori exogeni ai Prox-1, dar aceasta ar putea reprezenta o țintă terapeutică atractivă chiar în etapele timpurii ale limfangiogenezei.

Am studiat proliferarea LECs din aria tumorală și peritumorală prin metoda de dublă colorare imunohistochimică cu D2-40 și Ki67. În aceste condiții ipoteza de lucru a luat în considerare ca țintă terapeutică nu numai celulele tumorale, ci și LECs.

Pentru toate cazurile incluse în studiu dubla imunoreacție a fost pozitivă pentru Ki67 vizualizat în brun și pentru podoplanină, vizualizată în roșu. În condițiile menționate, vasele limfatice au fost identificate la toate cazurile incluse în studiu. Pentru cuantificare au fost luate în considerare doar celulele endoteliale care exprimă podoplanină raportat la coexpresia cu markerul de proliferare. În zonele cu infiltrat inflamator, vasele limfatice nu au avut caracter proliferativ, având contur neregulat și dilatații care sugerează că sunt preexistente.

În majoritatea cazurilor la care am observat emboli cu celule tumorale, celulele endoteliale limfatice corespondente nu sunt pozitive pentru Ki67. De notat este faptul că în embolii tumorali majoritatea celulelor tumorale exprimă Ki67 (peste 90%), indiferent de rata de proliferare a tumorii de origine.

Nu am găsit corelație statistic semnificativă între densitatea microvasculară limfatică și expresia Ki67 în celulele tumorale. Rata de pozitivare a celulelor endoteliale limfatice a fost variabilă, dar constant la tumorile avansate local am identificat vase proliferante, în special capilare limfatice din aria intratumorală.

În concluzie, vasele limfatice au fost prezente la toate cazurile

- Capilare limfatice cu endoteliu pozitiv pentru Ki67 am identificat la 23 dintre cele 50 de cazuri
- Pozitivarea pentru Ki67 a celulelor endoteliale limfatice nu se corelează cu gradul de pozitivare al celulelor tumorale, dar se corelează cu extensia locală a tumorii
- Prin prisma datelor noastre, proliferarea celulelor endoteliale din capilarele limfatice intra- și peritumorale este un element de prognostic nefavorabil.
- Este prima raportare din literatură a caracterului proliferativ al celulelor endoteliale limfatice asociate cu tumorile invazive ale vezicii urinare.

3.3.8. CLIC1 (chloride intracellular channel 1) este supraexprimat în tumorile vezicale infiltrative

Proteina canalelor intracelulare pentru clorid 1 (CLIC1) este membru al familiei CLIC umane, un grup de substanțe care reglează transportul transmembranar de clorid și consecutiv, sunt implicate într-o mare varietate de procese biologice, așa cum sunt transportul de clorid, agregarea plachetară, reglarea transportului transmembranar sau transducția semnalului. Mecanismul de acțiune al proteinei CLIC1 nu este complet elucidat. Proteina este inserată în membrana celulară pentru a forma canalele pentru ioni clorid. Activitatea acestor canale este dependentă de pH, și este implicată în reglarea ciclului celular

CLIC1 este exprimat într-o mare varietate de tumori umane, atât maligne, cât și benigne.

În privința uroteliului normal și tumoral nu am găsit date disponibile. Expresia CLIC1 la nivel proteic nu a fost încă raportată în carcinoamele uroteliale invazive ale vezicii urinare. De altfel, căutarea în PubMed cu datele: CLIC1/bladder cancer/urothelial carcinoma/transitional cell carcinoma nu semnaleză niciun articol publicat în literatura mondială. În studiul prezent semnalăm expresia CLIC1, demonstrat imunohistochimic, în celulele tumorale ale carcinomului invaziv al vezicii urinare și în leziunile uroteliale asociate sincrone.

Rezultate

Uroteliul normal a fost negativ pentru CLIC1 la 12 dintre cele 14 cazuri la care a fost prezent pe secțiuni, iar la două a fost slab pozitiv. Structurile observate incidental în mucoasă, așa cum sunt cuiburile von Brunn, au fost de asemenea negative.

Leziunile displazice, identificate la 14 cazuri în imediata vecinătate a tumorii, au fost pozitive intens la 11 cazuri, moderat la 2 și slab la un caz. Reacția a fost evidentă chiar la cazurile moderat și slab pozitive, prin comparație cu uroteliul normal.

Toate cele patru leziuni de carcinom in situ identificate au fost intens pozitive pentru CLIC1, pe toată înălțimea epitelului.

Reacția imunohistochimică pentru CLIC1 a fost pozitivă la 47 dintre cele 50 de cazuri (94%), iar tumorile intens pozitive au prezentat mai multe modele de distribuție.

Vasele sanguine mici de la nivelul frontului de proliferare și invazie au fost constant și intens pozitive în endoteliu. Aspectul a fost constant în lamina propria și stroma tumorală, și doar ocazional observat la vasele din submucoasă sau/și musculara neinvadată.

Carcinomul urotelial slab diferentiat, cu aspect sarcomatoid a avut cea mai mare intensitate de expresie, ceea ce orientează a asupra unei posibile ținte terapeutice.

Cele două carcinoame scuamocelulare, ambele dezvoltate în trigonul vezical, au prezentat aceleași aspecte, adică reacție slabă, difuză și heterogenă în celulele tumorale. Spre deosebire de carcinoamele uroteliale slab diferențiate, în cele scuamocelulare aspectul a fost difuz dar cu intensitate moderată sau redusă. Majoritatea celulelor tumorale sunt însă pozitive, aici neobservându-se modelul heterogen de distribuție a produsului final de reacție.

CONCLUZII FINALE

Din studiul de patologie moleculară asupra celor 50 de cazuri de tumori vezicale infiltrative au rezultat următoarele concluzii:

1. Studiul morfologic al cazuisticii selecționate relevă predominanța carcinomului urotelial, aspect semnalat și în literatură. Majoritatea cazurilor au prezentat invazie profundă în musculară și au fost slab diferențiate. Formele particulare de carcinom urotelial au fost dezvoltate cu celule clare și sarcomatoide. Carcinoamele scuamocelulare și adenocarcinoamele sunt minoritare, dar sunt caracterizate prin parametri de mare agresivitate.
2. Observațiile noastre asupra supraexpresiei HER2 la nivel proteic semnalează imunoreacție pozitivă (+2 și +3) la 26.66% dintre cazuri. Această metodă atrage atenția asupra unui subgrup de pacienți cu tumori vezicale infiltrative care pot beneficia de terapia cu trastuzumab, asociată chimioterapiei convenționale. Considerăm că rezultatele noastre, deși obținute pe un număr relativ mic de cazuri aduc argumente majore pentru introducerea terapiei cu trastuzumab sau droguri similare la anumite cazuri de tumori vezicale invazive în musculara proprie, dar numai după testare prealabilă imunohistochimică și hibridizare in situ. Această metodologie se adresează tumorilor aflate în stadii avansate de evoluție, majoritatea slab diferențiate.
3. Am identificat expresia EGFR în celulele tumorale la 82.22% dintre tumorile vezicale invazive incluse în studiu. Am imaginat și pus în aplicare în studiul de față un sistem nou de scorificare a imunoreacției pentru EGFR. Au fost pozitive majoritatea carcinoamelor uroteliale, inclusiv formele microscopice particulare, și carcinoamele scuamocelulare, și au fost negative adenocarcinoamele și tumorile uroteliale bine diferențiate. Pe baza comparației cu supraexpresia HER2 am identificat trei subgrupe diferite de bolnavi (EGFR+/HER2-, EGFR+/HER2+ și EGFR-/HER2+), care pot beneficia de terapie țintită specifică și diferențiată.
4. VEGF nu reprezintă o țintă terapeutică în tumorile vezicale infiltrative. Doar 13.3% din cazurile noastre exprimă VEGF la nivel proteic, intensitatea fiind redusă și heterogenă. Expresia VEGF nu se corelează cu parametri clinicopatologici ai tumorii și nu reprezintă un element de prognostic individual sau predictiv pentru răspunsul la terapie. Invazia vaselor sanguine de către celulele tumorale se decelează optim pe preparate colorate pentru CD34. Având în vedere importanța clinică a acestui parametru, aplicarea metodei în carcinoamele uroteliale infiltrative devine obligatorie. MVD reprezintă un parametru prognostic util, se corelează cu invazia vasculară și cu gradul de diferențiere, dar nu recomandăm aplicarea sa constantă la toate cazurile. Vasele imature și intermediare reprezintă o țintă atractivă pentru terapia antivasculară și pot reprezenta elemente orientative pentru evaluarea răspunsului la terapie specifică.
5. Am demonstrat pentru prima dată existența vaselor imature și intermediare în tumorile vezicale infiltrative. Vasele imature predomină intratumoral, iar cele intermediare intratumoral periferic și peritumoral. Doar aceste două tipuri de vase pot reprezenta o țintă terapeutică viabilă pentru medicația antivasculară. MVD calculată doar pentru vasele imature și intermediare are mare valoare prognostică. Rata de proliferare a celulelor endoteliale reflectă cu acuratețe activarea și progresia angiogenezei tumorale și poate fi un candidat major la evaluarea eficienței terapiei antivasculară și antiangiogenice.
6. Observațiile noastre relevă identificarea vaselor limfatice la toate cazurile incluse în studiu. Am remarcat invazie limfovaculară cu densitate mai mare în vasele peritumorale decât în cele intratumorale. Considerăm că imunoreacția pentru

podoplanină este deosebit de eficientă pentru diagnosticul invaziei limfovaskulare. LMVD se corelează cu stadiul tumorii și gradul de diferențiere pentru carcinoamele de tip urotelial. Podoplanina este exprimată de către celulele tumorale la 17.02% dintre cazuri, fiind astfel o atractivă țintă terapeutică. Rezultatele noastre susțin testarea expresiei podoplaninei în tumorile vezicale infiltrative, având în vedere că există trei ținte terapeutice potențiale: miofibroblaste, endoteliul vaselor limfatice și selectiv, celulele tumorale.

7. Studiul proliferării celulelor endoteliale limfatice prin metoda de dublă imunocolorare cu podoplanină și Ki67 ne-a condus la următoarele concluzii: vasele limfatice au fost prezente la toate cazurile, capilare limfatice cu endoteliu pozitiv pentru Ki67 am identificat la 23 dintre cele 50 de cazuri, pozitivarea pentru Ki67 a celulelor endoteliale limfatice nu se corelează cu gradul de pozitivare al celulelor tumorale, dar se corelează cu extensia locală a tumorii. Prin prisma datelor noastre, proliferarea celulelor endoteliale din capilarele limfatice intra- și peritumorale este un element de prognostic nefavorabil. Este prima raportare din literatură a caracterului proliferativ al celulelor endoteliale limfatice asociate cu tumorile invazive ale vezicii urinare.
8. Am prezentat expresia CLIC1 la 94% dintre cazurile de tumori vezicale infiltrative. Supraexpresia se corelează semnificativ cu gradul de diferențiere și forma histopatologică, fiind evidentă pentru carcinoamele uroteliale și negativă sau foarte slab pozitivă pentru alte tipuri (adenocarcinom, carcinom scuamocelular). Rezultatele noastre susțin realizarea unui model experimental care să utilizeze CLIC1 ca țintă terapeutică în tumorile vezicale infiltrative. Menționăm că este prima raportare din literatură a CLIC1 în tumorile vezicale infiltrative.