

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL DE ANATOMIE ȘI EMBRIOLOGIE**

OANA ANDRADA IFTODE



TEZĂ DE DOCTORAT

**EVIDENȚIEREA ASPECTELOR PARTICULARE
ANATOMO-PATOLOGICE ÎN EVOLUȚIA
CANCERULUI CUTANAT EXPERIMENTAL CU
IMPACT PENTRU STUDIILE CLINICE**

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. ANDREI MOTOC

REZUMAT

**Timișoara
2017**

CUPRINS

I. PARTEA GENERALĂ.....	1
I.1. Cancerele de piele – noțiuni introductive	1
I.2. Particularități ale patologiei organului cutanat.....	3
I.2.1. Mecanismul fizio-patologic.....	3
I.2.2. Clasificarea cancerelor cutanate.....	5
I.2.2.1. Carcinomul bazocelular	5
I.2.2.2. Carcinomul scuamos celular	5
I.2.2.3. Melanomul malign.....	8
I.3. Cancerul cutanat – aspecte actuale ale evoluției cancerului la nivel mondial.....	12
I.3.1. Prevalența și incidența cancerului de piele	12
I.3.2. Evoluția cancerului de piele în lume.....	13
I.3.2.1. Cancerele de piele non-melanomice în Australia	13
I.3.2.2. Cancerele de piele non-melanomice în Europa	15
I.4. Studii clinice de raportare ale existenței cancerului cutanat	19
I.4.1. Radiația ultravioletă	19
I.4.1.1. Introducere	19
I.4.1.2. Abordări curente legate de atitudinea clinică.....	21
I.5. Transferul datelor științifice obținute în modele experimentale la om	23
I.5.1. Privire de ansamblu asupra epigeneticii.....	23
I.5.2. Rolul și importanța modelelor animale	26
I.5.2.1. Modele de cancer la șoarece în cercetarea preclinică	28
I.5.2.2. Modele animale pe șoarece tradiționale în dezvoltarea terapeutică	30
I.5.2.3. Modele de șoarece proiectate după cazurile de cancer la pacienți	32
II. PARTEA SPECIALĂ.....	37
II.1. Particularități <i>in vitro</i> ale cancerului cutanat	37
II.1.1. Liniile celulare.....	37
II.1.1.1. Introducere	37
II.1.1.2. Băncile de celule.....	39
II.1.1.3. Depozitarea și păstrarea liniilor celulare	39
II.1.1.4. Liniile celulare – modele fundamentale în studiul cancerului	40

II.1.2. Studiul comportamentului liniilor celulare de piele normale și tumorale în urma expunerii la radiații UV de tip B.....	44
II.1.2.1. Pregătirea liniilor celulare.....	44
II.1.2.2. Iradierea celulelor	46
II.1.2.3. Determinarea numărului de celule viabile	46
II.1.2.3.1. Metoda Trypan blue	46
II.1.2.3.2. Metoda Alamar blue.....	47
II.1.2.4. Verificarea capacității de migrare	47
II.1.2.5. Analiza statistică	47
II.1.2.6. Rezultate și discuții	48
II.1.2.6.1. Morfologia celulelor – expunerea la UVB	49
II.1.2.6.2. Capacitatea de migrare.....	51
II.1.2.6.3. Viabilitatea celulară.....	56
II.2. Modele de cancer cutanat experimental fotochimic	64
II.2.1 Introducere	64
II.2.2. Măsurători non-invazive ale parametrilor cutanați.....	70
II.2.3. Influența radiațiilor UVB asupra organului cutanat în model experimental animal.....	74
II.2.3.1. Materiale și metode	74
II.2.3.2. Rezultate și discuții	76
II.2.4. Modelul experimental de cancer indus fotochimic.....	84
II.2.4.1. Materiale și metode	84
II.2.4.2 Rezultate și discuții	85
II.3 Modele de cancer cutanat obținute prin xenogrefă	98
II.3.1. Introducere	1
II.3.2. Materiale și metode	1
II.3.2. Rezultate și discuții	1
CONCLUZII	115
BIBLIOGRAFIA	119

TEZA DE DOCTORAT

Evidențierea aspectelor particulare anatomo-patologice în evoluția cancerului cutanat experimental cu impact pentru studiile clinice

Rezumat

Cancerle de piele sunt cancer care apar de la diviziunea anormală sau mutația celulelor pielii. Există trei tipuri principale de cancer de piele: cancerul de piele cu celule scuamoase (SCC), cancerul de piele cu celule bazale (BCC) și melanomul. Cancerul de piele cu celule bazale și cancerul de piele cu celule scuamoase fac parte dintr-o categorie mai largă, cunoscută sub denumirea de cancer de piele non-melanomice (NMC), în timp ce melanomul este un tip de cancer agresiv care de obicei se prezintă ca o formațiune pigmentară, constituind categoria cancerelor melanomice (MC). Aproape 90 % din cazurile de cancer de piele sunt cauzate de o expunere exagerată la radiațiile UV. Supraexpunerea la radiațiile UV de obicei, ar fi rezultatul expunerii excesive la soare, dar recent, saloanele autobronzante au devenit mai populare în rândul generațiilor tinere și au contribuit la creșterea prevalenței cancerului pielii în mod semnificativ, ca un agent cancerigen. În timp ce radiația UV este factorul de mediu primar în cazul apariției acestui tip de cancer, alți factori pot fi incluși, dar nu sunt limitați doar la: fumat, HPV, sindroame genetice, radiații ionizante, sau utilizarea de medicamente imunosupresoare. A fost demonstrat experimental faptul că radiația UVB induce carcinogenează printr-un proces care include 2 stadii: de inițiere și de promovare. La nivel cutanat radiația UVB duce la activarea a doi factori transcripționali: factorul nuclear potențator kappa al celulelor activate B (NF-kB) și proteina activatoare (AP-1). Sunt implicați în procesele de diferențiere și proliferare celulară, în inflamație, fotoîmbătrânire, alterarea membranei keratinocitare unde induc și reacțiile de peroxidare lipidică cu formare de radicali liberi. În plus, mai stimulează secreția de citokine proinflamatorii în keratinocite, cresc activitatea metaloproteazelor din derm și alterează structura ADN-ului. Alterarea ADN-ului indusă de UVB reprezintă un element crucial în apoptoza UVB-mediată. În același timp UVB activează direct receptorul FAS (cunoscut și ca CD95 sau APO-1), determină cuplarea acestuia cu un ligand de pe membrana celulei țintă (FAS-L) ceea ce conduce la activarea unor proteaze numite caspaze și la formarea CSMI (complex semnalizator de moarte indusă) care determină apoptoza keratinocitelor.

Studii *in vitro*

Liniile de celule canceroase sunt sisteme model esențiale pentru investigarea mecanismelor implicate în cancer și în descoperirea terapiilor eficace. Liniile celulare utilizate în studiul de față au fost de două tipuri, normale și tumorale. În cazul liniilor celulare normale s-au utilizat keratinocite umane (HaCat) și fibroblaste umane din piele (1BR3). În ceea ce privește liniile celulare tumorale, acestea au fost: melanom uman (A375); melanom murinic B16-F0 și B164A5. Efectul radiației UVB asupra morfologiei celulelor a fost verificat la diferite momente de timp: înainte de expunerea la UVB, la 3 ore și 24 ore după expunere. În figura 9 sunt prezentate imagini reprezentative ale modificărilor legate de forma keratinocitelor și fibroblastelor după expunerea la UVB. Modificările notabile ale formei celulelor au fost detectate la 24 ore după expunere, unele dintre celule au fost detașate de pe placa de cultură și forma lor a devenit rotundă, o formă caracteristică pentru celulele apoptotice. Aceste modificări au fost vizibile într-un grad mai mare la keratinocite, rezultate care sunt în concordanță cu datele înregistrate pentru analiza viabilității.

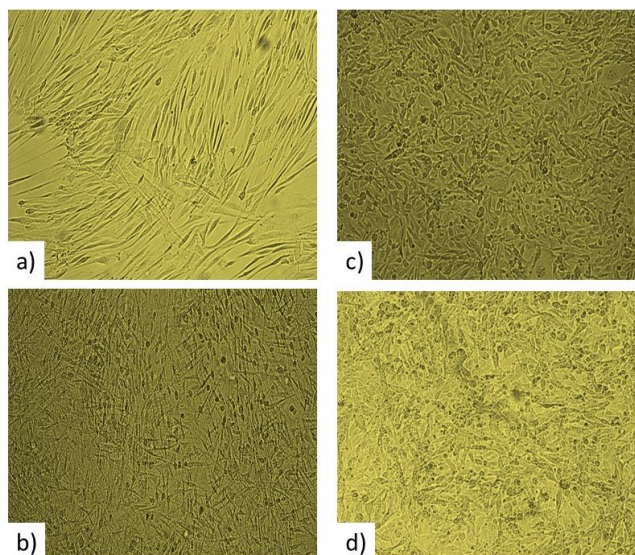


Figura 9. Aspectul celulelor normale: a) fibroblaste la 3h după iradiere, b) fibroblaste la 24h după iradiere, c) keratinocite la 3h după iradiere și d) keratinocite la 24h după iradiere

Efectul radiației UVB asupra viabilității celulelor a fost verificat la momente diferite de timp: la 30 min și 1 oră (prin metoda Trypan blue - evaluare

timpurie) și la 3, 6 și 24 ore după expunere (prin testul Alamar blue). Au fost observate următoarele: keratinocitele umane - viabilitatea acestora a scăzut la aprox. 80% la 30 de minute, în timp ce o scădere semnificativă a fost observată la o oră, procentul celulelor viabile fiind de aproximativ 50%, ceea ce indică efectul citotoxic al radiației UVB. În cazul fibroblastelor umane - 1BR3, efectul a fost opus celui observat în cazul celulelor HaCat, acest tip fiind mai afectat în primele 30 de minute post-expunere. Rezultate similare cu cele observate pentru 1BR3 au fost observate în celulele melanomului uman - A375, numărul de celule viabile crescând cu perioada post-expunere. În cazul celulelor melanomului murinic - B164A5 și B16F0, efectul citotoxic al radiației UVB nu a fost atât de pronunțat în primele 30 de minute după expunere, comparativ cu cel observat în celulele A375. Pentru a observa comportamentul liniilor celulare utilizate în studiu pentru perioade mai lungi după expunerea la radiațiile UVB (3, 6 și 24h), numărul de celule viabile a fost evaluat prin tehnica Alamar blue. Ca și celule de control au fost utilizate celulele care nu au fost expuse radiației UVB. Rezultatele obținute indică faptul că numărul celulelor umane normale viabile (keratinocitele HaCat și fibroblastele 1BR3) a scăzut în timp, cea mai semnificativă scădere fiind observată la 24 ore după expunere. Conform rezultatelor noastre, keratinocitele au fost mai sensibile la efectul radiațiilor UVB în comparație cu fibroblastele, ceea ce ar putea fi susținut de faptul că efectele dăunătoare UVB apar mai ales la nivelul epidermei, cantitatea de radiații care penetrează dermul fiind mai redusă. În cazul celulelor melanomului uman ne-pigmentat - A375, tendința a fost similară celei descrise pentru celulele sănătoase, cu diferența că numărul celulelor viabile a scăzut semnificativ începând cu 3 ore după expunere și continuând în același mod până la 24 ore, când procentul celulelor viabile a fost mai mic de 40%. Celulele melanomului murinic - B164A5 și B16-F0 sunt pigmentate, fiind celule producătoare de melanină, iar expunerea la UVB determină o scădere a viabilității lor, cea mai semnificativă scădere fiind observată la 24h pentru B164A5, în timp ce în cazul B16-F0 la 24h, celulele păreau să recupereze procentul de celule viabile fiind mai mare decât la 6 ore după expunere.

Studii *in vivo*

Șoareci adulți, atât masculi, cât și femele, SKH-1 în vârsta de 12-14 săptămâni au fost împărțiți în patru grupuri (5 șoareci / grup) după cum urmează: Grupul 1 - grupul de control feminin; Grupul 2 - grupul de control masculin; Grupul 3 femele - expuse la UVB; Grupul 4 – masculi expuși la UVB (Figura 21). Protocolul a inclus iradierea cu lumină UV de tip B timp de 2 minute (doza totală de iradiere UVB 180 J / m²), de două ori pe săptămână, timp de 20

săptămâni, pentru grupurile 3 și 4 (148). Radiația UV de tip B a fost generată folosind aparatul VL-6.M / 6W (la o lungime de undă 312 nm) (Vilber Lourmat, Franța).

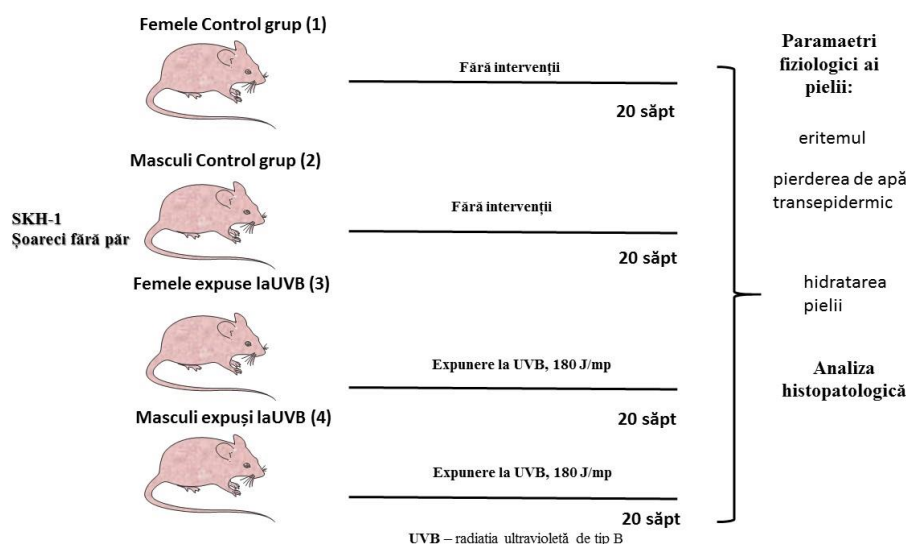


Figura 21. Protocolul de expunere al animalelor de experiență la radiații ultraviolete de tip B

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele nocive la nivelul pielii induse de expunerea repetată la radiații UVB (inițiator și promotor tumoral).

Datele noastre au arătat că, în timpul testelor, toți parametrii au fost modificați ca o consecință a iradierii UVB. O creștere a nivelului hemoglobinei a fost observată în grupurile 3 și 4, mai pronunțată în cazul masculilor expuși la UVB. Referitor la grupurile 1 și 2, valorile eritemului se află în limite normale situate între 100 – 130 unități. În ceea ce privește pierderea de apă transepidermică, valori în limite normale au fost înregistrate la femelele și masculii din grupurile de control, iar în ceea ce privește femelele expuse la UVB o creștere până în 30 unități a fost înregistrată, iar în lotul de masculi expuși la UVB creșterea a fost și mai însemnată depășind 30 de unități.

Un alt model de șoarece, de carcinogeneză a pielii în două etape, a fost obținut conform protocoalelor descrise în literatură, dar cu câteva modificări: prima etapă - inițierea dublă a tumorii a constat în expunerea la radiații ultraviolete (UVB) timp de 5 min. Prin aplicarea topică a soluției de acetona cu 7,12-dimetilbenzantracen (DMBA) (aplicare de 0,025 - 200μL) la 30 min după expunerea la UVB o dată pe săptămână timp de o săptămână; a doua etapă -

promovarea tumorii: expunerea la radiația UVB timp de 5 minute, urmată de aplicarea în mod topic a unui ester forbol pro-inflamator, soluție de acetonă cu 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetat (TPA) (15 nM - 200 μ L). Procedurile din această fază au fost efectuate de două ori pe săptămână până la sfârșitul experimentului - 21 săptămâni. Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele nocive la nivelul pielii induse de expunerea concomitentă și repetată (21 săptămâni) la 3 agenți toxici (mediu și chimici): radiații UVB (inițiator și promotor tumoral), DMBA (inițiator tumoral) și TPA promotor tumoral) (Figura 33). Conform literaturii de specialitate, șoarecii fără păr reprezintă un instrument important pentru studierea efectelor diferiților agenți la nivelul pielii, șoarecii SKH-1 fiind o tulpină utilizată foarte frecvent în modelele animale de cancer de piele. Expunerea la radiații UVB cu 30 min înainte de aplicațiile topice cu soluțiile de DMBA și TPA a reprezentat o schimbare în protocolul clasic pentru carcinomul cutanat în două etape, descris în literatură. Șoarecii incluși în studiu au fost monitorizați și analizați macroscopic la fiecare două zile în timpul experimentului pentru numărarea și înregistrarea incidenței și numărului de papiloame. Conform rezultatelor noastre, apariția primului papilom a fost observată începând cu a unsprezecea săptămână de experiment în grupul expus radiațiilor UVB și TPA. După 10 săptămâni de experiment nu a fost detectat niciun papilom în grupul 3 (expus radiației UVB, DMBA și TPA), în timp ce pielea a prezentat leziuni cum ar fi roșeață și uscăciune atât în grupul 3, cât și în grupul 2 - radiația UVB + acetonă. În săptămâna 16 de experiment, papiloamele au fost vizibile și palpabile în grupul 3, iar numărul de papiloame a crescut de la săptămâna a 19-a de experiment comparativ cu lotul 2 care nu s-a dezvoltat.

Nu s-au înregistrat schimbări importante a pierderii de apă transepidermică în cazul grupurilor 1 (control) și 2 (expus la UVB și acetonă): valorile TEWL indică o creștere foarte ușoară, care este specifică pentru toți compușii cu grade diferite de toxicitate aplicați local. În cazul șoarecilor din grupul 3, creșterea pierderii transsepidermice a apei a fost mai pronunțată și acești doi agenți pot fi considerați ca agenți cu efect nociv asupra pielii. Pierderea de apă transepidermică este un parametru fiziologic utilizat pentru a verifica funcția și integritatea de barieră a pielii, această barieră fiind perturbată în patologiiile cutanate. Valorile pH-ului pielii au prezentat fluctuații foarte ușoare și neliniare, între 0.2 și 0.6 unități. A existat o ușoară creștere a valorilor înregistrate pentru acei șoareci care au fost expuși la UVB, DMBA și TPA.

În studiul de față, au fost evaluate unele caracteristici tumorale, cum ar fi: incidența tumorii, randamentul tumorii și multiplicitatea tumorii. Datele noastre

au arătat că, după 21 de săptămâni de experiment, toți șoarecii expuși la acțiunea celor trei substanțe cancerigene (UVB, DMBA și TPA) au dezvoltat tumori. Chiar dacă, în literatura publicată, mulți autori au descris că, după expunerea la UVB, șoarecii au dezvoltat numai papiloame (considerând aceste leziuni drept leziuni premaligne) care pot regresa sau evolua spre carcinom cu celule scuamoase, în studiul prezent au fost observate diferite alte tipuri de leziuni premaligne în evoluția experimentală a carcinomului cu celule scuamoase. Acest model de carcinom al pielii indus fotochimic la șoareci fără păr, SKH-1, folosind UVB ca promotor tumoral, s-a dovedit a fi un model viabil, reproductibil de carcinom al pielii care poate fi utilizat pentru testarea efectelor anti-proliferative ale diferitelor medicamente naturale și sintetice.

Un alt model animal elaborate a implicat utilizarea celulelor canceroase și a imunosupresiei. Șoareci adulți, femele, Balb C în vârstă de 10-12 săptămâni au fost împărțiți în patru grupuri (5 șoareci / grup) după cum urmează: Grupul 1 - grupul de control; Grupul 2 – injectate cu soluție de ser fiziologic (solventul pentru ciclofosfamidă); Grupul 3 – cu imunosupresie; Grupul 4 – cu imunosupresie și xenogrefă de A375. Ciclofosfamida utilizată în studiu pentru inducerea imunosupresiei este sub formă de pulbere care poate fi dizolvată în ser fiziologic. Astfel, ciclofosfamida a fost administrată i.m. în 3 doze (concentratia finală: 180mg/kg corp șoarece) astfel: cu 5 zile înainte de inocularea celulelor tumorale, cu 3 zile înainte de inoculare, cu o zi înainte de inocularea celulelor tumorale.

S-a injectat i.m. soluția de ciclofosfamidă și dozele calculate conform protocolului, apoi s-au inoculat celulele tumorale subcutanat. Protocolul a presupus parcurgerea următoarelor etape: a) s-au cântărit șoarecii înainte de fiecare administrare a soluției de ciclofosfamidă; b) au fost calculate dozele și volumul de soluție necesar injectării; c) a fost injectată soluția în zilele prevăzute la aceeași oră; d) au fost inoculate celule tumorale A375 subcutanat (1×10^7 celule/șoarece). Greutatea șoarecilor a fost monitorizată și după administrarea ultimei doze de ciclofosfamidă, precum și pe toată durata studiului (imunosupresia este asociată cu scădere în greutate). Au fost urmăritți parametri biochimici și parametri fiziologici ai pielii.

Obiectivele prezentului studiu au fost de a observa variațiile în ceea ce privește greutatea corporală, modificările care au loc la nivelul pielii, apariția tumorilor după inocularea celulelor (la cât timp de la inoculare, masa tumorii și volumul tumorii).

Un sistem imunitar sănătos include toate elemente care sunt în echilibru unul cu celalalt iar influențele negative care duc la distrugerea acestui echilibru, conduc la deteriorarea funcției de a proteja organismul împotriva agenților sau proceselor dăunătoare. Astfel, s-a dezvoltat model animal pentru studiul parametrilor cutanați în urma inducerii imunosupresiei și inoculării de celule tumorale. Ciclofosfamida este un imunosupresor și mecanismul său este similar cu cel al imunosupresiei virale. Ciclofosfamida poate deteriora structura ADN-ului, ucide celulele imune, interferează cu proliferarea și diferențierea celulelor mamare macrofage, T și B și restrânge răspunsul imun humoral și celular. Animalele tratate cu Ciclofosfamidă sunt adesea folosite ca modele de imunodeficiență sau imunosupresie. Șoarecii imunosupresați cu ciclofosfamidă sunt utilizați pentru studiul reglementării imune a medicamentelor.

Inducerea imunosupresiei și inocularea de celule tumorale, conduce la variații majore legate de valorile parametrilor cutanați care se manifestă prin: scăderea funcției de barieră a pielii, prin pierderea de apă transepidermic, creșterea valorilor eritemului și a nivelului de deshidratare a pielii.