

Titlul proiectului: Studiu privind utilizarea expresiei genei E4 a HPV in zona de transformare a colului uterin ca marker de excludere a riscului de progresie catre cancer

Rezumat: Demonstrarea prezentei ADN papillomaviral in tesuturi tinta nu este suficienta pentru a afirma existenta unei infectii productive sau persistente si, cu atat mai putin neoplazia iminenta. Rezultatul relatiei dintre virus si celula gazda este multifacetat, motiv pentru care selectarea pacientilor cu risc prin simpla prezenta a materialului genetic viral poate produce supradiagnostic. Unii din acesti pacienti au o imunitate care nu va permite replicarea virala si, in consecinta clearance-ul viral se va produce rapid, altii vor dezvolta infectii productive pe un tesut care sustine replicarea virala. In ambele situatii riscul dezvoltarii neoplaziei este neglijabil. Oprirea evenimentelor in faza precoce (early), datorata fie caracteristicii de nepermissivitate a tesutului (asa cum credem ca este cazul cu metaplazia imatura persistenta) fie unei inabilitati a unei variante virale de a cupla faza tardiva a infectiei poate conduce la dezvoltarea cancerului.

Vom investiga prezenta proteinei E4 a HPV si a acizilor nucleici ce o genereaza (luind in considerare efectul antioncogenic ce li se atribuie si faptul ca sint perceputi ca garantii diferentierii) la pacientele HPV pozitive, ca marker de infectie pozitiva si, deci, inocua. Vom folosi tehnici de biologie moleculara si imunohistochimie pe probe citologice recoltate in timpul screeningului iar rezultatele le vom compara cu aspectele observate pe preparatele histologice tratate cu metode IHC, concentrindu-ne pe metaplazia imatura.

Din leziunile de grad inalt intilnite vom tenta izolarea si secventierea ORF E4, cautind posibile alterari de structura ce ar putea explica infectia abortiva.

Vom desfasura studiul citologic si histologic folosind o noua substanta fixatoare (fixatorul HOPE) reputata a prezerva proteinele si acizii nucleici, permitind mai buna lor detectie in probe incluse la parafina sau citologii.

Obiective generale si specifice:

Obiectivul proiectului este **gasirea unei modalitati de sensibilizare a mijloacelor existente utilizate in depistarea precoce si preventia cancerului de col uterin**. Desi descris cu mai bine de 50 de ani in urma, screeningul citologic este inca modalitatea cea mai buna de preventie. Utilizarea lui corecta a condus, in Statele Unite la declasarea cancerului de col de pe locul doi pe locul opt in ierarhia celor mai frecvente malignitati ale femeii. Managementul screeningului se schimba periodic, inglobind cele mai noi cercetari asupra etiologiei si patogeniei bolii. Scopul este sa se discrimineze in cazul situatiilor in care nu exista leziune vizibila pe col (si pacienta are nevoie de o urmarire mai stricta decit intervalul de screening) cine ramine in supraveghere si cit timp.

Obiectivele specifice:

1. Investigarea semnificatiei pe care **expresia genei E4 a HPV o are pe diverse tipuri de epiteliu metaplazic** ce reprezinta etapele de evolutie fiziologica a zonei de transformare a colului uterin
2. **Elaborarea unor protocoale de diagnostic citologic si histologic care sa permita diferentierea riscului in cazuri ambigue, utilizand pentru aceasta expresia genei E4, care este corelata cu diferentierea finala a tesutului tinta**

Introducerea ipotezei conform careia virusul papilloma ar fi implicat in producerea neoplaziei a facut sa se identifice o modalitate de evaluare a riscului in functie de prezenta acestui microorganism. In prezent se admite ca femeile cu anomalii citologice dar fara tulpini virale cu risc au sanse minime de a avea sau dezvolta displazii de grad inalt in urmatorul interval de screening, astfel incit ele pot fi excluse din supravegherea stricta impusa de existenta anomaliei citologice. Situatia in care femeia are o anomalie citologica si o tulpina virala cu risc este mai ambigua in ceea ce priveste riscul-unele femei din aceasta categorie fac, altele nu fac leziuni de grad inalt. Intrucit infectia virala este inocua pe un tesut diferentiat deplin (este sustinuta replicarea virala), ramine ca, logic, sa fie la risc doar femeile cu structuri tisulare incomplet diferentiate, nepermissive pentru replicarea virala. Daca am putea aprecia gradul de diferentiere a epiteliului metaplazic din zona de transformare am avea indicii in plus de selectie a pacientelor si posibilitatea de a distruge o structura imperfecta pentru a stimula cresterea unui epiteliu matur. Intrucit cercetarea fundamentala in domeniul virusologic a confirmat ca produsii genei E4

apar doar in celule terminal diferite intentionam sa implementam aceasta observatie in diagnosticul de zi cu zi.

Obiective colaterale:

1. **Cunoasterea prevalentei tulpinilor virale in masa femeilor cu anomalii citologice**,in Romania-Asemenea studii orientate lipsesc in tara noastra,iar perspectiva introducerii vaccinarii face necesara cunoasterea circulatiei regionale a tipurilor virale pentru a aprecia gradul de adecvare a ofertei comerciale sau a orienta spre o alta compozitie a vaccinului,mai adecvata conditiilor locale.

2. **Corelarea aspectelor citologice ,histologice si virusologice pe cazuri specifice**-Studiile asupra progresiei leziunilor preneoplazice se bazeaza ,in general, pe evolutia rezultatului citologic si pe existenta unei leziuni localizabila colposcopic care permite biopsia tintita.In situatii cu colposcopie negativa se considera ca biopsia nu este indicata,neexistind un criteriu de orientare.Proiectul nostru intentioneaza sa investigheze histologic unele cazuri fara anomalii vizibile colposcopic,incercind sa discrimineze,imunohistochimic,caracteristicile tesutului aparent normal,dar suspect citologic.

3. **Cunoasterea caracteristicilor turn-overului tisular la nivelul zonei de transformare a colului uterin**.Metaplazia epidermoida este considerata un fenomen fiziologic,totusi etapele prin care trece,de la aparitia celulei de rezerva si pina la epiteliul stratificat,matur,glicogenat,nu sint cunoscute in termeni de ierarhie si compartimentare ale celulelor.Lipsa unor date mai concrete ne obliga sa privim epiteliul metaplazic intr-un mod global,nediscriminator,ce ne face sa incapabili de a identifica "precursorul precursorilor"dintre fatetele multiple ale unui epiteliu normal.Credem ca,utilizind imunohistochimia si tehnicile de biologie moleculara am putea aprofunda cunoasterea acestei zone,sediul aparitiei a peste 90% din cazurile de cancer scuamos.

Durata proiectului: 28 luni

Director de proiect: Conf. Dr.Stanescu Anca

stanescuancadaniela@yahoo.com

Programul 4 – Parteneriate in domeniile prioritare			
Directia de cercetare	4.1.3	Tipul proiectului	PC
Acronimul Propunerii	HPE	Numarul alocat la inregistrarea on-line	2633

Parteneri implicați în proiect

lei

Institutia	2007		2008		2009		2010		Total	
	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C
CO –UMF Carol Davila Buc	80000	-	446680	-	253320	-	20000	-	800.000	-
P1 Institutul de Virusologii e St. S. Nicolau Buc.	50000	-	178680	-	321320	-	50000	-	600.000	-
P2 INCD Victor Babes Bucuresti	50000	-	134010	-	315990	-	100000	-	600.000	-
Total proiect	180000		759370		890630		170000		2.000.000	

Anul	Etape/ Activități	Organizația executantă	Rezultate/ Documente de prezentare a rezultatelor
2007	Etapa I Alcatuirea loturilor și stabilirea metodologiei de lucru		Stabilirea loturilor de studiu și armonizarea metodelor de lucru
	CO Activitate I.0.1 -stabilirea criteriilor de includere în loturi	UMFCD	Realizarea loturilor de studiu
	Activitate I.0.2 -alegerea metodelor de recoltare, stocare, transport ale probelor biologice	UMFCD	Certificarea posibilității de prelucrare a probelor recoltate de CO în aplicațiile alese ca metode de investigare (Testarea fixatorului HOPE comparativ cu alți fixatori)
	Activitate I.0.3 -testarea compatibilității materialului biopsic cu metodele de diagnostic ale partenerilor	UMFCD	Stabilirea protocolului de lucru
	Activitate I.0.4 -realizarea unei baze de date care să permită integrarea și împartirea datelor între parteneri	UMFCD	Baza logistică pentru integrarea rezultatelor
	Activitate I.0.5 -elaborarea formularului de acord al pacientului pentru înrolarea în studiu	UMFCD	Asigurarea eticii medicale a studiului
	Partener 1 Activitate I.1.1 -documentare privind tehnicile virusologice utilizate în diagnosticul infecției HPV	IVN	Bibliografie
	Activitate I.1.2 -evaluarea metodelor de diagnostic de biologie moleculară disponibile sau descrise la nivel mondial pentru alegerea testelor celor mai semnificative	IVN	Standardizarea metodelor pentru aplicarea pe materialul biologic propus
	Activitate I.1.3 -testarea compatibilității metodelor alese cu materialul biologic furnizat de CO	IVN	Alegerea bateriei de teste
	Partener 2 Activitate I.2.1 -Documentare în vederea stabilirii panelului de anticorpi cu care să fie definită zona de transformare și prezența proteinei E4	INCDVB	Bibliografie
	Activitate I.2.2 Alegerea panelului de anticorpi pentru IHC și ICC	INCDVB	Panelul de anticorpi
2008	Etapa II-Studiul clinic și paraclinic al zonei de transformare a colului uterin și corelarea cu statusul HPV		Caracterizarea IHC a zonei de transformare la pacientele cu infecție HPV
	CO Activitate II.0.1 -Examinarea colposcopică a pacientelor cu anomalii citologice și stocarea imaginilor	UMFCD	Selectare pacienți
	Activitate II.0.2 -Recoltarea de probe citologice și biopsice ce vor fi stocate	UMFCD	Material biologic prelevat și prezervat
	Activitate II.0.3 -Completarea fișei pacientului	UMFCD	Baza de date
	Activitate II.0.4 -Precizarea aspectului histologic al zonei de transformare (normal/anormal)	UMFCD	Diagnostic histologic
	Partener 1 Activitate II.1.1 - Efectuarea de teste pe probele citologice pentru selectarea femeilor HPV pozitive și aflarea tulpinei pe care o adăpostesc	IVN	-Selectie pacienți HPV pozitive -Prevalența tulpinilor virale în grupul de femei cu anomalii citologice
	Activitate II.1.2 - Evidențierea transcripției E4 în probe citologice (calitativă și semicantitativă)	IVN	Selectie cazuri cu infecție productivă

	Activitate II.1.3 -Tentarea evidentierii in situ a transcriptiei E4 pe biopsiile femeilor cu niveluri detectabile de E4	IVN	Confirmarea infectiei productive la nivel tisular
	Partener II Activitate II.2.1 Evaluarea IHC a caracteristicilor celulelor din ZT in ceea ce priveste tipul de legaturi intercelulare	INCDVB	Caracterizarea ZT
	Activitate II.2.2 Evaluare IHC a caracteristicilor celulelor din ZT cu privire la pozitia lor in ciclul celular(cicline S, M)	INCDVB	Caracterizarea ZT
	Activitate II.2.3 -Evaluare IHC a caracteristicilor celulelor din ZT cu privire la compartimentele ce compun structura epiteliala(p63)	INCDVB	Caracterizarea ZT
	Activitate II.2.4 -Evaluarea IHC a unor markeri luati in discutie mai recent(ep-CAM)	INCDVB	Caracterizarea ZT
2009	Etapa III Evaluarea expresiei E4 pe probe biopsice si investigarea variantelor virale din leziunile de grad inalt		-Corelarea expresiei E4 la nivel histologic cu cea la nivel molecular -Identificarea de variante virale ce ar putea explica multiplele rezultante ale infectiei virale
	CO Activitate III.0.1 Continuarea selectarii de noi paciente pina la un lot statistic semnificativ	UMFCD	Material biologic prelevat si prezervat
	Activitate III.0.2 -Reevaluarea citologica si colposcopica a pacientelor deja selectate,la un an de la includere	UMFCD	Urmarirea evolutiei
	Activitate III.0.3 Recoltarea si stocarea de probe biologice de la paciente cu leziuni de grad inalt in vederea izolarii si caracterizarii de variante virale	UMFCD	Material biologic prelevat si prezervat
	Activitate III.0.4 Completarea bazei de date cu rezultatele preliminare de la toti partenerii	UMFCD	Baza de date
	Partener I Activitate III.1.1 -Continuarea determinarii prezentei HPV cu genotipare	IVN	Lot statistic semnificativ
	Activitate III.1.2 -Izolarea de ADN HPV din leziuni de grad inalt	IVN	Verificarea ipotezei ca leziunile de grad inalt se datoresc unor variante virale
	Activitate III.1.3 -Secventiere ADN HPV din leziuni de grad inalt	IVN	Verificarea ipotezei ca leziunile de grad inalt se datoresc unor variante virale

	Partener II Activitate III.2.1 -Testare prin IHC a probelor de la paciente infectate cu HPV16	INCDVB	Expresia E4 pe probe biopsice
	Activitate III.2.2 -Testarea prin IHC a probelor biopsice de la paciente purtatoare de alte tulpini virale decit HPV16	INCDVB	Verificarea posibilitatii de utilizare a anticorpului TVG 405 in diagnosticul IHC al infectiilor cu alte tipuri virale decit 16
	Activitate III.2.3 Testare imunocitochimica pe probe citologice a prezentei proteinei E4 la paciente infectate cu HPV16	INCDVB	Expresia E4 pe probe citologice
	Activitate III.2.4 Testare imunocitochimica pe probe citologice infectate cu alte tulpini decit 16	INCDVB	Verificarea posibilitatii de utilizare a anticorpului TVG 405 in diagnosticul ICC al infectiilor cu alte tipuri virale decit 16
2010	Etapa IV Elaborarea de protocoale de practica pentru sensibilizarea diagnosticului histologic si citologic utilizind expresia E4	UMFCD	Protocoale de diagnostic citologic si histologic mai sensibile
	CO,Partener I,Partener II Activitate IV.1 -Corelarea datelor de la toti partenerii cu elaborarea unei strategii de diagnostic sensibilizat in depistarea precoce si preventia cancerului de col	UMFCD IVN INCDVB	Elaborarea raportului final ; analiza statistica
	Activitate IV.2 Compararea cu datele din literatura	UMFCD IVN INCDVB	Date comparative
	Activitate IV.3 Diseminarea informatiilor	UMFCD IVN INCDVB	Analiza finala a datelor studiului Elaborare de articole,comunicari Articole comunicate si publicate