

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**



TEZĂ DE DOCTORAT

**Studiul clinic, histopatologic și imunohistochimic
al tumorilor de vezică urinară**

- REZUMAT -

**Conducător de doctorat:
Prof. univ. dr. Laurențiu Mogoantă**

**Doctorand:
Mihai Lucian ȘTEFĂNESCU**

CRAIOVA, 2019

Introducere

Cancerul vezicii urinare este o boală extrem de răspândită și este asociată cu o morbiditate și o mortalitate ridicate. Datele clinice din ultimii ani au arătat că această formă de cancer, la nivel mondial, este al VII-lea cel mai frecvent cancer la bărbați și al XVII-lea cel mai frecvent cancer la femei (Klaile Y, Schlack K, Boegemann M, et al, 2016). Cea mai frecventă formă de neoplazie a vezicii urinare este carcinomul urotelial, denumit anterior carcinom cu celule de tranziție, tumoră care se dezvoltă din uroteliu.

Incidența carcinomului vezicii urinare în țările din Uniunea Europeană este de aproximativ 100.000 de cazuri noi pe an, în timp ce mortalitatea acestei boli ajunge până la 30.000 de pacienți pe an (Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2015). Aproximativ 70%-80% din carcinoamele uroteliale al vezicii urinare sunt reprezentate de carcinoame invazive non-musculare (NMIBC), care cuprinde stadiile Ta, T1 și Tis primară (Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al, 2013). Restul de circa 20% din cancerurile vezicii urinare sunt carcinoame invazive în tunica musculară și sunt extrem metastazante (Li Y, Lin K, Yang Z, et al, 2017).

În ciuda prevalenței sale ridicate, mecanismul molecular implicat în apariția carcinomului vezicii urinare și progresia acestuia, nu este descifrat până la ora actuală. Date histopatologice și genetice arată că tumorile provin dintr-o singură celulă dar, pe măsură ce tumorile cresc, ele devin din ce în ce mai heterogene, datorită modificărilor genetice și fenotipice care apar în timpul tumorigenezei.

CAPITOLUL I. Anatomia și histofiziologia aparatului urinar

Veziica urinară este un rezervor musculo-membranos în care urina (secretată continuu de rinichi și adusă prin uretere) se acumulează în intervalul dintre micțiuni, iar de aici este excretată prin uretră la exterior. La adult vezica urinară este un organ pelvin; atunci când este plină, aceasta depășește simfiza pubiană prin partea ei superioară și vine în contact cu peretele abdominal. Spațiul pe care îl ocupă vezica în excavația pelvină poartă numele de "loja vezicală", delimitată de simfiza pubiană (înainte), aponevroza prostato-peritoneală (înapoi), peritoneu (cranial), prostata (caudal) și de mușchii ridicători anali (lateral).

Capacitatea medie a vezicii (la care se declanșează senzația de micțiune) este de 200-250 ml; capacitatea fiziologică maximă este de 300-350 ml, iar în stări patologice ajunge la 5 litri.

Mijloacele de fixare ale vezicii sunt multiple, însă cel mai important este perineul. La bărbat, fundul vezicii aderă intim de prostată și prin intermediul ei se sprijină solid pe diafragma pelviană; la femeie, fundul vezicii vine în contact direct cu diafragma urogenitală.

Structura vezicii prezintă trei straturi: stratul extern fibroseros, stratul mijlociu muscular și stratul intern mucos. Grosimea peretelui este de circa 4-7 mm la vezica goală și 2 mm la cea plină. Stratul extern (tunica seroasă) – este format de peritoneu. Acesta acoperă numai fața posterioară și o parte a fețelor laterale ale vezicii, reflectându-se pe rect sau uter. Restul peretelui vezicii urinare este delimitat de

adventice, structură conjunctivă care leagă vezica urinară de organele pelvine și scheletul micului bazin. Tunica mijlocie, reprezentată de stratul muscular este alcătuită din fibre musculare netede, la care se adaugă o rețea bogată de fibre elastice (cu rol în distensia pereților vezicali). Tot la acest nivel există și mușchiul detrusor (alcătuit din trei straturi musculare: extern - cu fibre longitudinale, mijlociu - cu fibre circulare și intern – cu fibre dispuse plexiform). Contractia acestui mușchi ajută la golirea vezicii urinare. Stratul intern sau mucos, căptușește întreaga suprafață internă a vezicii. Ea se continuă cu mucoasa ureterelor și a uretrei. Când vezica este goală, mucoasa prezintă numeroase pliuri dispuse neregulat, care dispar când vezica se umple.

CAPITOLUL II. Carcinogeneza tumorilor de vezică urinară

Tumorile derivate din epiteliumul căilor urinare sunt descrise sub diverse denumiri: "tumori uroteliale", "excreto-urinare", "paramalpighiene", "tumori cu celule tranziționale". Termenul de „tumoră cu celule tranziționale” este adoptat și utilizat în țările anglo-saxone; cel de „tumoră urotelială” a fost recomandat de Conferința Consens asupra Neoplasmelor Uroteliale organizată de OMS și de ISUP (*International Society of Urologic Pathology*), în 1998 (Reuter VE, 2004) și acceptată de către OMS în 2004.

De mai bine de 20 de ani, tumorile uroteliale ale vezicii urinare sunt împărțite în "tumori superficiale" și „tumori invazive”. Acești doi termeni au fost introduși de către urologi pentru a distinge tumorile limitate la mucoasă, care pot fi tratate endoscopic, de tumorile care invadează musculara proprie (Rosai J, 2004).

Din punct de vedere histopatologic, tumorile superficiale includ trei categorii tumorale distincte prin morfologie, potențial evolutiv și tumorigeneză:

- tumorile uroteliale papilare non-invazive (tumori **pTa**);
- carcinomul urotelial *in situ* (tumori **pTis**);
- tumorile care invadează corionul mucos, dar cu respectarea musculareii proprii (tumori **pT1**).

Aceste trei varietăți tumorale prezintă un interes particular atât pentru patolog, cât și pentru urolog, deoarece din punct de vedere anatomopatologic este dificil de apreciat cu certitudine stadiul pT; tumorile pTa ridică în continuare probleme de clasificare, frontiera între tumorile benigne și cele maligne nefiind încă clar stabilită; tumorile pT1 sunt tumori cu risc crescut de progresie, a căror evoluție este dificil de prevăzut.

În acest moment cercetătorii și clinicienii recunosc două căi moleculare distincte implicate în tumorigeneza și progresia carcinoamelor uroteliale vezicale: una dintre acestea conduce la geneza tumorilor uroteliale superficiale care au tendință la recurențe locale frecvente, dar prezintă un risc scăzut de progresie tumorală, iar cealaltă cale generează tumori mai agresive, invazive.

Tumorile uroteliale stabile genetic, reprezentate de tumorile uroteliale papilare neinvazive, au un nivel scăzut de atipii citoarhitecturale, recurențe frecvente și risc scăzut de progresie tumorală (tumori G1/G2, pTa). Ele prezintă numai câteva alterări genetice, deleții ale cromozomului 9 (adesea afectând întregul cromozom) și mutațiile genei FGFR3; în cazul acestor tumori, mutațiile și amplificările genei TP53 sunt rare, iar aneuploiditatea tumorală apare în mai puțin de 50% din cazuri (Hartmann A, 1999).

Carcinoamele uroteliale invazive (pT1-4) își au originea fie într-un carcinom urotelial papilar cu grad înalt de malignitate, neinvaziv (G3, pTa), fie într-un carcinom urotelial "in situ" (CIS/pTis). La nivel genetic aceste trei entități morfologice sunt foarte diferite de tumorile uroteliale papilare cu grad scăzut de malignitate non-invazive. În lumina informațiilor genetice disponibile, se impune o nouă subdiviziune a carcinoamelor uroteliale vezicale, recomandându-se evitarea, pe cât posibil, a includerii tumorilor uroteliale pTa și pT1 în grupul „tumorilor uroteliale superficiale”.

Modificările moleculare care apar în carcinoamele uroteliale vezicale, pot fi grupate în trei mari categorii: alterări cromozomiale cu rol în carcinogeneză; pierderea reglării ciclului celular, responsabilă pentru proliferarea celulară; metastazarea, indusă de evenimente precum angiogeneza tumorală (Williams SG, 2004).

CAPITOLUL III. Tratamentul tumorilor vezicale

Metoda de elecție în tratamentul tumorilor vezicale superficiale este rezecția endoscopică transuretrală (TURV). Rezecția endoscopică reprezintă tratamentul primar al tumorilor vezicale superficiale, cu viză de radicalitate permite, pe lângă îndepărtarea întregii tumori vizibile macroscopic, obținerea de specimene pentru examenul histopatologic, controlul rezecției prin prelevarea de biopsii din patul de rezecție, prelevarea de biopsii randomizate pentru a controla starea uroteliului. Prelevarea de biopsii de câmp urotelial vezical, aparent normal, este în prezent o atitudine disputată între partizanii ideii că, în acest fel, este posibilă descoperirea concomitenței Tis, mult mai agresivă decât tumora primară exofitică, și cei care invocă riscul implantării iatrogene de celule tumorale, exfoliate în timpul cistoscopiei și rezecției, în zonele de mucoasă denudată de aceste biopsii.

Cistectomia totală este rar necesară la pacienții cu tumori superficiale; excepție fac doar tumorile papilare nerezecabile sau/și carcinoamele "in situ" care nu răspund la terapia intravezicală. Pentru aceste cazuri selecționate, rata de supraviețuire este bună.

Indicațiile cistectomiei la pacienții cu tumori vezicale Ta, T1, Tis (Soloway MS, 1996) sunt: pacient de vârstă tânără, cu tumoră multifocală, grading 3; Tis concomitent, poziționată într-o zonă greu de rezecat (perete vezical anterior, posterior) cu T1 cel puțin la re-TURV; recurența sub tratament BCG.

Unii autori afirmă că pacienții în stadiile Ta și T1 tratați prin cistectomie au avut rata de supraviețuire comparabilă cu a persoanelor de aceeași vârstă cu ei din populația sănătoasă.

La pacienții cu tumori vezicale de grad mare, cu o responsivitate scăzută la terapia conservatoare și la care s-a efectuat imediat cistectomia, rata de supraviețuire la 5 ani a fost de aproape 80%, spre deosebire de alți pacienți, la care s-a temporizat cistectomia și la care în momentul deciziei de a efectua cistectomia aveau deja infiltrare musculară sau chiar mai mult, și deci un prognostic rezervat (Freeman și colab., 1995).

Tratamentul adjuvant al tumorilor vezicale superficiale este variat și include: chimioterapia instilațională, imunoterapia instilațională, chimio-imunoterapia.

CAPITOLUL IV. Studiul clinico-statistic

Obiectivele principale ale studiului au fost de a determina numărul de pacienți diagnosticați cu tumori de vezică urinară, internați în perioada 2013-2015 în Clinica de Urologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, de a afla numărul și tipul de intervenții la care aceștia au fost supuși pe durata spitalizării, precum și stadiul afecțiunii în momentul diagnosticării, motivele internării și explorările paraclinice utilizate în diagnosticul afecțiunii. În studiu au fost incluși un număr de 1073 de pacienți cu tumori de vezică urinară. Datele privind vârsta, sexul și mediul de rezidență al pacienților, motivele internării, antecedentele personale patologice, factorii de risc prezenți, examenul obiectiv, examenele paraclinice, stadiul afecțiunii, tipul intervenției suferite, au fost obținute din foile de observație clinică.

De-a lungul celor trei ani de studiu, numărul de pacienți internați cu tumori de vezică urinară a variat relativ puțin, de la 323 (în 2015) la 369 (în 2014).

Repartiția pacienților lotului nostru în funcție de sex, pe anii studiați, a fost:

- în anul 2013 din totalul de 369 pacienți, 234 au fost de sex masculin și 135 de sex feminin, raportul bărbați/femei fiind de 1,73/1.

- în anul 2014, din 381 cazuri, 269 au fost de sex masculin și 112 sex feminin, raportul bărbați/femei fiind de 2,4/1;

- în anul 2015, din cei 323 pacienți, 238 au fost de sex masculin și 85 de sex feminin, raportul bărbați/femei fiind de 2,8/1;

Din totalul de 1073 de pacienți cu tumori vezicale, 741 (69,06%) au fost bărbați și 332 (30,94%) femei, raportul bărbați/femei pe întregul lot fiind de 2,23/1.

În ceea ce privește distribuția pacienților în funcție de mediul social, din 1073 de cazuri, 709 (66%) au fost din mediul rural și 364 (34%) din mediul urban.

Evaluarea distribuției pacienților lotului nostru în funcție de vârstă ne-a permis să remarcăm faptul că tumorile vezicale au fost diagnosticate la persoane adulte cu vârste de la 40 la 99 de ani; cei mai mulți pacienți cu tumori vezicale au fost înregistrați în decadele de vârstă 60-69 de ani (362 de pacienți) (33,74%) și respectiv 70-79 de ani (372 de pacienți) (34,67%).

După aspectul macroscopic al tumorii și caracterelor morfologice și evolutive, în lotul nostru am identificat:

- 528 de cazuri de tumori vegetante din care: 163 au fost tumori primare, 101 tumori recidivante, 141 tumori vegetante unice și 123 tumori vegetante multiple;

- 846 de tumori superficiale din care: 246 au fost tumori primare, 171 recidivante, 204 cazuri de tumori superficiale unice, iar 219 cazuri de tumori superficiale multiple;

- 116 tumori sesil-pediculate din care: 35 au fost tumori primare, 23 recidivante, 39 unice și 19 multiple;

- 88 tumori sesile din care: 26 din cazuri au avut tumori primare, 18 recidivante, 32 unice și doar 12 tumori sesile multiple;

- 216 au fost tumori pediculate din care: 46 au fost tumori primare, 62 tumori recidivante, 63 tumori pediculate unice și 45 tumori multiple;

- 352 au fost tumori vezicale infiltrative din care: 92 primare, 84 recidivante, 99 infiltrative unice și 77 multiple.

Localizarea tumorilor a fost foarte variată: 51 de pacienți au prezentat tumori vezicale la nivelul trigonului; 152 la nivelul peretelui posterior, 156 de cazuri au prezentat tumori la nivelul peretelui anterior, 308 tumori au fost găsite la nivelul peretelui lateral drept și 406 pe peretele lateral stâng.

În ceea ce privește patologia asociată tumorilor de vezică urinară, în studiul nostru am observat că cel mai mare număr de pacienți (657) au prezentat infecție de tract urinar asociată, 609 pacienți au prezentat hematurie, 273 de pacienți au prezentat adenomul de prostată, 199 ureterohidronefroza, 209 cazuri HTA, iar 476 de pacienți au prezentat cardiopatia ischemică, diabet zaharat, insuficiența vertebro-bazilară.

CAPITOLUL V. Aspecte histopatologice ale tumorilor de vezică urinară

Materialul biologic studiat histopatologic a fost reprezentat de 32 de fragmente de tumori ale vezicii urinare recoltate în timpul unor rezecții endoscopice transuretrale a formațiunilor tumorale prezente în vezică, provenind de la un număr de 32 de pacienți diagnosticați clinic, paraclinic și cistosopic cu tumori vezicale.

Studiul histopatologic al carcinoamelor uroteliale a evidențiat o multitudine de aspecte microscopice, care arată că tumorile vezicale prezintă un polimorfism structural marcat. Heterogenitatea tumorală poate fi explicată prin teoria monoclonală, adică prin posibilitatea de apariție de tumori multiple de la o singură celulă transformată malign, care are capacitatea de a genera clone diferite de celule tumorale sau, prin teoria câmpului malign care arată că expunerea uroteliului la factorii de risc importanți pentru cancerul vezicii urinare, cum ar fi fumatul, carcinogenii ocupaționali, etc, provoacă modificări celulare diferite în celulele epitelului de acoperire, în diferite locuri ale acestuia, ducând la apariția concomitentă a mai multor celule neoplazice.

Aspectele microscopice ale carcinomului papilar urotelial au fost diferite de la un pacient la altul, demonstrând că factorii etiopatogenici implicați în carcinogeneza urotelială pot fi diferiți sau gradul de implicare al lor în procesul de carcinogeneză poate fi diferit.

Carcinomul urotelial poate prezenta două forme clinice și histopatologice care au mecanisme fiziopatologice de apariție diferite: forma papilară sau neinvazivă și forma muscular-invazivă. În studiul nostru, cele mai multe tipuri de carcinoame uroteliale au fost de tip papilar, caracterizate prin excrescențe epiteliale în jurul unor axe stromale conjunctivo-vasculare. Stroma tumorală, formată din matricea extracelulară, celulele conjunctive, vasele de sânge și limfatice, are un rol esențial în creșterea celulelor tumorale. În studiul nostru au fost identificate mai multe tipuri de celule stromale în micromediul tumoral: fibroblaste, celule endoteliale, pericite, celule ale sistemului imun, macrofage asociate tumorii, etc. Noi considerăm că toate aceste celule din micromediul stromal cooperează între ele pentru proliferarea și metastazarea tumorilor, deoarece am sesizat că numărul și morfologia celulelor stromale diferă în funcție de gradele de diferențiere ale tumorii și de invazivitatea tumorală.

În studiul nostru am remarcat că unele carcinoame uroteliale invazive în lamina propria sau chiar în tunica musculară a vezicii urinare au fost asociate cu focare de necroză, mai mult sau mai puțin extinse, care au afectat toate elementele structurale ale stromei conjunctive.

Carcinomul urotelial invaziv a avut o stromă celulară cu fibroblaste numeroase și o colagenizare variabilă sau o stromă hipocelulară cu fond mixoid. Rareori, tumora induce o proliferare exuberantă a fibroblastelor, care prezintă atipie celulară alarmantă. Această caracteristică, deși un indiciu util pentru invazie, nu ar trebui să fie confundată cu componenta celulară a cancerului urotelial sarcomatoid. În studiul nostru, la circa 25% din cazurile examinate de carcinoame uroteliale invadante în tunica musculară au fost evidențiate invazii limfovaskulare, ceea ce denotă posibilitatea existenței unor metastaze în alte organe.

CAPITOLUL VI. Studiul imunohistochimic al tumorilor de vezică urinară

Materialul biologic selectat pentru studiul imunohistochimic a fost același utilizat în studiul histopatologic, respectiv cele 32 de fragmente de tumori de vezică urinară recoltate în timpul rezecțiilor endoscopice transuretrale, practicate în cazul unor formațiunilor tumorale prezente în vezică.

Pornind de la constatările că markerii imunohistochimici și moleculari ar putea fi utilizați ca adjuvanți ai metodelor clasice de histopatologie pentru a ajunge la un diagnostic mai precis al leziunilor vezicii urinare și că aceștia oferă mai multe date pentru caracterizarea aspectului celular al tumorilor, în studiul nostru pentru caracterizarea imunohistochimică a carcinoamelor uroteliale am utilizat anticorpii anti-citokeratina 20 (anti-CK20) anti-proteina p53 (anti-p53) și anti-Ki67, anti-CD34 și anti-VEGF.

Expresia aberantă a CK20 în celulele uroteliale plus supraexprimarea p53 și Ki-67 sunt indicatori ai modificării displazice apărute în celulele epiteliale din mucoasa urotelială. În studiul nostru, toate carcinoamele uroteliale au prezentat o reacție imunohistochimică pozitivă la marcarea cu anticorpii anti-CK20, ceea ce sugerează că acest imunomarker ar putea fi utilizat pentru diagnosticul pozitiv și diferențial al carcinoamelor uroteliale, mai ales în leziunile metastatice ale căror punct de plecare nu a putut fi identificat. Cu toate acestea, trebuie să menționăm că reacția celulelor tumorale la CK20 a fost variabilă, ceea ce demonstrează o mare variabilitate fenotipică a celulelor tumorale.

Proteina p53 este produsul genei TP53, denumită "gardianul genomului", genă care reglementează progresia ciclului celular, senescenta și apoptoza. În studiul nostru, expresia imunohistochimică a proteinei p53 a fost extrem de variabilă. Astfel, am identificat carcinoame uroteliale bine diferențiate, non-invazive în care expresia p53 a variat de la moderat la intens. O situație similară s-a înregistrat și la carcinoamele uroteliale invazive. În concluzie, expresia imunohistochimică a proteinei p53 nu s-a corelat în studiul nostru cu gradul tumorii sau formele invazive versus non-invazive. Intensitatea reacției imunohistochimice variabilă a proteinei p53 arată existența unor grade de afectare variate ale genomului celular cu acumularea de mutante ale genei TP53 în cantități diferite, ceea ce ne conduce la concluzia că factorii patogeni implicați în procesul de carcinogeneză urotelială sunt extrem de variați, iar intensitatea cu care acționează asupra uroteliului este, de asemenea, variabilă. Rezultatele noastre concordă cu cele ale Agenției Internaționale pentru Cercetare a Cancerului care a arătat că modificările genice se exprimă prin modificări ale fenotipului celulelor tumorale, care induc aspecte clinice variate în ceea ce privește evoluția și prognosticul bolii.

Pentru a evalua capacitatea proliferativă a celulelor tumorale ale carcinomului urotelial, noi am utilizat ca și marker imunohistochimic, anticorpul anti-Ki67. În studiul nostru reacția carcinoamelor uroteliale la anticorpul anti-Ki67 a fost variabilă în funcție de gradul tumoral, în sensul că a fost moderată sau redusă în carcinoamele papilare de grad scăzut și intensă în carcinoamele papilare de grad înalt.

Angiogeneza este o parte esențială a multor procese fiziologice, cum ar fi adaptarea țesuturilor la hipoxie sau regenerare tisulară după leziuni traumatice, inflamatorii sau ischemice acute. Angiogeneza este de o importanță crucială pentru creșterea tumorilor și supraviețuirea celulelor neoplazice. Pentru evaluarea procesului de angiogeneză tumorală noi am utilizat anticorpul anti-CD34. Imunomarcarea specifică a celulelor endoteliale ne-a permis să constatăm că vascularizația tumorală este extrem de variabilă de la o tumoră la alta, chiar dacă era același tip de carcinom. Ca atare, putem afirma că vascularizația carcinoamelor uroteliale nu s-a corelat cu gradul tumoral.

Unul dintre factorii cheie în angiogeneza tumorală este factorul de creștere al endotelial vascular (VEGF). În studiul nostru expresia imunohistochimică a VEGF a fost identificată în toate celulele tumorale, fiind mai intensă în carcinoame slab diferențiate.

CAPITOLUL VII. Concluzii generale

În studiul nostru am evaluat un număr de 1073 de pacienți diagnosticați cu tumori de vezică urinară, internați în perioada 2013-2015, în Clinica de Urologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, ceea ce arată că în fiecare zi calendaristică se internează o persoană cu tumoră vezicală.

Cancerul de vezică urinară afectează preponderent bărbații. În studiul nostru 741 (69,06%) au fost bărbați și 332 (30,94%) femei, raportul bărbați/femei pe întregul lot fiind de 2,23/1.

În ceea ce privește distribuția pacienților în funcție de mediul social, 709 (66%) au fost din mediul rural și 364 (34%) din mediul urban.

Vârsta reprezintă un factor de risc; cancerul de vezică urinară se dezvoltă la adulți și afectează preponderent bărbații peste 60 de ani. În studiul nostru, în decadele de vârstă 60-69 și respectiv 70-79 de ani au fost înregistrați un număr de 362, respectiv 372 de pacienți, reprezentând 68,40% din totalul pacienților.

Studiul histopatologic și imunohistochimic al carcinoamelor uroteliale a evidențiat o multitudine de aspecte microscopice care denotă faptul că tumorile vezicale prezintă un polimorfism structural accentuat. Dintre markeri imunohistochimici expresia cea mai constantă a fost pentru citocheratina 20 (CK20), pentru markerul de proliferare celulară Ki-67 și pentru factorul de creștere al endotelial vascular (VEGF)

