
Semnificația clinicopatologică a unor markeri moleculari în diagnosticul și prognosticul tumorilor gastrointestinale la câine și pisică

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Student doctorand **Andrada-Gabriela Negoescu**

Coordonator științific **Prof.univ. dr. Cornel Cătoi**



INTRODUCERE

Tumorile gastrointestinale reprezintă mai mult de un sfert din totalul formațiunilor neoplazice care se pot dezvolta la om (Sung și colab., 2021). În ultimii ani, s-a observat o creștere alarmantă a numărului de cazuri la nivel global, fiind raportate anual aproximativ 2 milioane de noi diagnostice și aproximativ 900.000 de decese (Xi și colab., 2021; Morgan și colab., 2022). Un aspect îngrijorător este creșterea numărului de pacienți tineri diagnosticați la nivel global cu astfel de neoplazii (Vuik și colab., 2019). În România, conform unui studiu realizat în 2018 și publicat în 2021, numărul de noi cazuri de neoplazii colorectale a fost de 14.085, aflându-se într-o continuă creștere (Ionescu și colab., 2021). Deși utilizarea animalelor de laborator oferă avantaje semnificative în cercetarea tumorilor umane, rata de succes a translației rezultatelor de la modelele animale la om în studiile clinice oncologice este de aproximativ 8% (Marck și colab., 2014).

Tumorile gastrointestinale la câini și pisici sunt rare comparativ cu cele diagnosticate la oameni, fiind identificate în mai puțin de 1% din cazuri. Totuși, există numeroase similități între neoplasmele dezvoltate la aceste specii și cele umane, în special în cazul tumorilor epiteliale. Aceste asemănări sunt observate atât la nivel microscopic, cât și la nivel molecular, incluzând mutații genetice precum KRAS, CTNNB1, TP53 și EGFR, implicate în carcinogeneză (Groll și colab., 2021). Mai mult, similitudini semnificative au fost identificate și în cazul limfoamelor la câini și oameni, atât din punct de vedere clinic, cât și în ceea ce privește biologia tumorală, comportamentul neoplazic și prezența unor aberații genetice comune (Marconato și colab., 2013).

Având în vedere dificultățile și implicațiile etice asociate utilizării câinilor și pisicilor în experimente, o alternativă promițătoare pentru studierea tumorilor gastrointestinale este reprezentată de obținerea de linii celulare provenite din neoplaziile diagnosticate la aceste specii. Un exemplu este linia celulară FeLeco-G7, derivată dintr-un adenocarcinom colorectal la pisică, care a fost xenotransplantată cu succes la șoareci, oferind rezultate promițătoare (Uneyama și colab., 2024).

Astfel, având în vedere impactul major al tumorilor gastrointestinale la nivel global și rata ridicată a mortalității în rândul pacienților, este esențială identificarea unor noi markeri de diagnostic și prognostic, precum și dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare.

STRUCTURA LUCRĂRII

Lucrarea intitulată „Semnificația clinicopatologică a unor markeri moleculari în diagnosticul și prognosticul tumorilor gastrointestinale la câine și pisică” are un număr total de 119 de pagini și este redactată conform normelor academice în vigoare. Aceasta este structurată în două părți principale.

Prima parte, de natură bibliografică, este organizată în trei capitole și se întinde pe 16 pagini. În această secțiune am sintetizat cadrul actual al cunoașterii privind epidemiologia principalelor tumori gastrointestinale la animalele de companie, tehnicile de diagnostic, incluzând tabloul clinic, metode imagistice, citologice, histologice, imunohistochimice și analize bazate pe micro-ARN, precum și mecanismele de oncogeneză.

A doua parte a lucrării cuprinde cercetările personale desfășurate în perioada 2021-2025, fiind extinsă pe 70 pagini și structurată în patru capitole. Fiecare capitol este împărțit în subcapitole ce detaliază scopul și obiectivele studiului, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute, precum și o analiză a acestora prin comparație cu alte studii existente. De asemenea, fiecare studiu este încheiat cu concluzii parțiale relevante.

Rezultatele cercetării sunt ilustrate prin 34 de figuri și sintetizate în 11 tabele. Lucrarea se încheie cu bibliografia citată, care cuprinde 236 titluri.

REZULTATELE CERCETĂRII

În partea a doua a prezentei lucrări, am studiat identificarea de noi markeri imunohistochimici cu posibilă utilitate în diagnosticul și prognosticul tumorilor gastrointestinale la câine și pisică. Obiectivele pe care ni le-am propus, au constat în:

- Realizarea unui studiu epidemiologic retrospectiv interinstituțional în șase țări a leziunilor neoplazice și proliferative non-neoplazice gastrointestinale la câine și pisică.
- Analiza expresiei BMP-2 în osteosarcomul intestinal canin prin tehnica imunohistochimică.
- Caracterizarea imunohistochimică a gastritei foliculare la câine și corelația acesteia cu colonizarea helicobacteriană și limfomul gastric canin.
- Analiza expresiei 14-3-3σ în tumorile intestinale epiteliale la câine și pisică și evaluarea potențialului de diagnostic și prognostic al acesteia.

Capitolul 5, intitulat „Leziuni proliferative non-neoplazice și neoplazice ale tractului gastrointestinal la câine și pisică: studiu epidemiologic interinstituțional și caracterizare morfologică.” a avut drept scop realizarea unui studiu epidemiologic interinstituțional, prin identificarea leziunilor non-neoplazice proliferative și a formațiunilor neoplazice cu localizare gastrointestinală la câine și pisică. Datele epidemiologice au fost colectate retrospectiv din bazele de date ale instituțiilor publice (universități) și laboratoare private din șase țări: România, Brazilia, Portugalia, Polonia, Rusia și Israel, acoperind o perioadă de 10 ani. Un total de 475 de cazuri de leziuni neoplazice și non-neoplazice proliferative au fost selectate și supuse analizei statistice. Animalele vârstnice au fost mai predispuse la gastropatia pilorică hipertrofică cronică

(CHPG)(vârsta medie de 11,2 ani) și polipi gastrici (vârsta medie de 9,6 ani), în timp ce indivizii tineri au prezentat o incidență mai mare pentru fibroplazia sclerozantă eozinofilică gastro-intestinală felină (FGIESF), cu o vârstă medie de 7,25 ani pentru leziunile localizate la nivelul stomacului și de 5,25 ani pentru cele din intestin. De asemenea, CHPG și FGIESF au fost mai frecvente la masculi. La nivelul tractului gastrointestinal tumorile maligne au prezentat ponderea cea mai mare de 88%. Dintre acestea limfoamele au avut o incidență de 38,74%, iar adenocarcinoamele de 27,16%. La pisici limfoamele au fost diagnosticate cel mai frecvent, cu 141 cazuri. Câinii au fost specia principal afectată de neoplasme benigne, incluzând leiomiome (58,62%) și adenoame (42,10%). În ceea ce privește neoplasmele maligne, câinii au fost mai predispuși în a dezvolta adenocarcinoame (92 cazuri). La câini, adenocarcinoamele au constituit 39% din cazuri, urmate de limfoame (12%) și GIST (9%). Indiferent de specie, intestinul subțire a fost cea mai frecventă localizare a leziunilor gastrointestinale.

Capitolul 6: intitulat „Markeri moleculari utilizați în diagnosticul și prognosticul unor tumori gastrointestinale rar întâlnite la câine și pisică: osteosarcom intestinal”, studiul a avut drept scop prezentarea unui caz de osteosarcom intestinal, potențial indus de consumul recurent de fragmente de bumbac provenite din diferite materiale textile. Astfel, pentru acest caz, s-a realizat evaluarea stării clinice a pacientului, respectiv examene biochimice, hematologice și imagistice (ecografie), iar în urma laparotomiei exploratorii s-au colectat probe în formol 10%, în vederea realizării examenului histopatologic și imunohistochimic. În urma analizei histopatologice, la nivelul jejunului a fost identificată o masă neoplazică transmurală, ulcerată pe suprafață, alcătuită din celule dispuse în fascicule pe mai multe planuri, printre care, multifocal, a fost identificat un material eozinofilic, acelar, interpretat ca osteoid, confirmat prin colorația specială Masson Trichrom. Imunohistochimic, celulele neoplazice au prezentat o expresie citoplasmatică moderată pentru BMP-2. Totuși, celulele neoplazice multinucleate au fost intens pozitive pentru același anticorp. De asemenea, s-a urmărit evoluția clinică a pacientului, cu identificarea metastazelor la nivel hepatic la 6 luni după operație.

Capitolul 7, intitulat „Gastrita foliculară (hiperplazia limfo-foliculară gastrică) la câine: aspecte patologice și imunohistochimice” a avut ca scop principal evaluarea și caracterizarea din punct de vedere imunohistochimic a gastritei foliculare la câine. În vederea îndeplinirii acestui scop, ne-am propus următoarele obiective: evaluarea leziunilor endoscopice și a manifestărilor clinice la câinii diagnosticați cu GF(gastrită foliculară), evaluarea gradului de colonizare cu *Helicobacter* spp. și a inflamației asociate gastritei foliculare, caracterizarea imunohistochimică a distribuției limfocitelor la nivelul foliculilor limfoizi și comparația acestora cu limfoamele gastrice, utilizându-se anticorpii CD3, Pax5 și BCL6. Mai mult, s-a realizat corelația între gastrita foliculară, modificări ale mucoasei gastrice asociate și colonizarea *Helicobacter* spp.. Astfel, în cadrul studiului, au fost analizate 41 de cazuri de GF la câini. Câinii tineri, cu o medie de vârstă de 3,52 ani, din rasa Bulldog Francez (75,06%) au fost mai predispuși în a dezvolta GF. Endoscopic, au fost identificați noduli limfoizi atât în antrul gastric, cât și în corpul gastric, iar ulcerile gastrice au fost observate în 9/41 cazuri. Diametrele foliculilor limfoizi au fost similare atât în corpul gastric (media 295,587 μm), cât și în antru (media 294,641 μm). Histopatologic, leziunile asociate GF au inclus atrofia glandulară, cu un număr mai mare de cazuri la nivelul zonei antrale (10/17 cazuri), inflamație limfoplasmocitară și fibroză (Fig.18). În ceea ce privește colonizarea helicobacteriană, au fost

notate colonizări minime, moderate și severe în 20, 6 și, respectiv, 3 cazuri. În cazul colonizărilor minime, bacteriile spiralate au fost identificate doar pe suprafața mucoasei în comparație cu gradul sever, în care acestea au fost observate și la nivelul criptelor gastrice și în citoplasma celulelor parietale (Fig.19). În urma examenului imunohistochimic, limfocitele B pozitive pentru Bcl6 și Pax5 au fost localizate central în foliculi mari, fiind delimitate de limfocite T CD3+ (Fig.20). Foliculii mici nu au avut centre germinale, fiind absentă imunomarcarea pentru Bcl6, și au prezentat atât limfocite T CD3+, cât și B Pax5+. Comparativ, au fost evaluate imunohistochimic 2 limfoame de tip T și 2 limfoame de tip B. În ambele cazuri, imunomarcarea s-a realizat difuz fără a fi observată formarea de structuri foliculare. În ceea ce privește limfoamele T, acestea au fost pozitive pentru CD3, cu rare limfocite B Bcl6+ și Pax5+ distribuite multifocal. Limfoamele B au fost pozitive pentru Pax5, negative pentru CD3 și cu un număr însemnat de limfocite pozitive pentru Bcl6. A fost găsită o corelație pozitivă între diametrul foliculului și colonizarea cu *Helicobacter* spp. ($p = 0,049$) și hiperplazia foliculară ($p < 0,001$). O analiză de regresie a indicat faptul că colonizarea cu *Helicobacter* spp. și hiperplazia explicau 42,3% din variația diametrului foliculului ($R^2 = 0,423$, $p < 0,001$).

Capitolul 8, intitulat „Semnificația clinicopatologică a expresiei proteinei 14-3-3σ în tumorile epiteliale intestinale la câine și pisică” a pornit cu scopul evaluării expresiei proteinei 14-3-3σ în tumorile intestinale la câine și pisică, precum și determinarea potențialului său ca marker de diagnostic și prognostic. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: analiza retrospectivă a leziunilor tumorale epiteliale gastrointestinale, luând în considerare date clinicopatologice relevante (specie, rasă, vârstă, sex), clasificarea histologică a formațiunilor tumorale conform standardelor Organizației mondiale a sănătății, incluzând stadializarea și analiza gradului de invazie tumorală și evaluarea expresiei proteinei 14-3-3σ în tumorile intestinale, utilizând metode imunohistochimice și cuantificare digitală. Astfel, în cadrul acestui studiu au fost incluse 43 de cazuri de tumori intestinale, cu 35 identificate la câini (16 adenoame și 19 adenocarcinoame) și 8 adenocarcinoame la pisici. Adenoamele au fost localizate exclusiv la nivel rectal. Histopatologic, subtipul papilar a avut o incidență mai mare în adenoame cu 62,5%. Similar, adenocarcinoamele papilare (47,36%) au fost mai frecvente la câine, în timp ce subtipul tubular, a fost mai frecvent diagnosticat la pisici (75%). În ceea ce privește stadializarea, la câini gradul 1 a avut ponderea cea mai însemnată (52,63%), în timp ce la pisici gradul 4 a fost identificat în 63% din cazuri, fără a fi observat gradul 1. Imunohistochimic, imunomarcarea pozitivă pentru 14-3-3σ a fost identificată în 62,96% din adenocarcinoame și 56,25% din adenoame. La câini, 57,89% din adenocarcinoame au prezentat marcarea pozitivă, cu intensitate moderată în majoritatea cazurilor. La pisici, toate cele 8 adenocarcinoame au prezentat imunomarcare citoplasmatică, cu intensitate preponderent moderată. Mai mult, 14-3-3σ a fost exprimată în majoritatea adenocarcinoamelor tubulare și papilare, dar și într-un caz anaplastic. De asemenea, imunomarcare nucleară a fost observată sporadic, asociată cu metastaze și embolii. La câini nu au fost identificate diferențe semnificative statistic între numărul de figuri mitotice și procentul de suprafață marcată. Comparativ, la pisici, adenocarcinoamele au prezentat o activitate proliferativă intensă, independent de expresia markerului ($p < 0,05$), indicând un comportament agresiv. De asemenea, la câini, suprafața marcată este semnificativ mai mare decât infiltrarea tumorală în straturile histologice, sugerând că expresia proteinei 14-3-3σ are loc precoce, înainte

de pătrunderea profundă a tumorii, în comparație cu pisicile unde deși există o corelație între suprafața marcată și gradul de invazie tumorală, aceasta este mai redusă, indicând o posibilă scădere a expresiei proteinei pe măsură ce patologia avansează.

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

1. Biénès, T., Leal, R. O., Domínguez-Ruiz, M., De Carvalho, R. E., Rodrigues, N. F., Dally, C., Husson, J., Le Boedec, K., & Hernandez, J. (2022). Association of gastric lymphofollicular hyperplasia with *Helicobacter*-like organisms in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(2), 515–524. <https://doi.org/10.1111/jvim.16387>
2. Carney, J. A. (2010). Gastric Mucosal Lymphoid Follicles: Histology, Distribution, Frequency, and Etiologic Features. *American Journal of Surgical Pathology*, 34(7), 1019–1024. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181e1acb0>
3. Day, M. J., Bilzer, T., Mansell, J., Wilcock, B., Hall, E. J., Jergens, A., Minami, T., Willard, M., & Washabau, R. (2008). Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology*, 138, S1–S43. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.01.001>
4. Faucher, M. R., Biourge, V., German, A. J., & Freiche, V. (2020). Comparison of clinical, endoscopic, and histologic features between dogs with chronic gastritis with and without lymphofollicular hyperplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 256(8), 906–913. <https://doi.org/10.2460/javma.256.8.906>
5. Groll, T., Schopf, F., Denk, D., Mogler, C., Schwittlick, U., Aupperle-Lellbach, H., Sarker, S. R. J., Pfarr, N., Weichert, W., Matiassek, K., Jesinghaus, M., & Steiger, K. (2021). Bridging the Species Gap: Morphological and Molecular Comparison of Feline and Human Intestinal Carcinomas. *Cancers*, 13(23), 5941. <https://doi.org/10.3390/cancers13235941>
6. Hardas, A., Suárez-Bonnet, A., Beck, S., Becker, W. E., Ramírez, G. A., & Priestnall, S. L. (2021). Canine Gastric Carcinomas: A Histopathological and Immunohistochemical Study and Similarities with the Human Counterpart. *Animals*, 11(5), 1409. <https://doi.org/10.3390/ani11051409>
7. Head, K.W.; Cullen, J.M.; Dubielzig, R.R.; Else, R.W.; Misdrop, W.; Patnaik, A.K.; Tateyama, S.; van der Gaag, I. (2003). Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals. In World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2nd ed.; Schulman, F.Y., Ed.; Armed Forces Institute of Pathology: Washington, D.C., pp. 73–110.
8. Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 931–943. <https://doi.org/10.1038/nrc1230>
9. Ikuse, T., Ohtsuka, Y., Obayashi, N., Jimbo, K., Aoyagi, Y., Kudo, T., Asaoka, D., Hojo, M., Nagahara, A., Watanabe, S., Blanchard, T. G., Czinn, S. J., & Shimizu, T. (2018). Host response genes associated with nodular gastritis in *Helicobacter pylori* infection. *Pediatrics International*, 60(5), 446–454. <https://doi.org/10.1111/ped.13527>
10. Ionescu, E. M., Tieranu, C. G., Maftai, D., Grivei, A., Olteanu, A. O., Arbanas, T., Calu, V., Musat, S., Mihaescu-Pintia, C., & Cucu, I. C. (2021). Colorectal Cancer Trends of 2018 in Romania—An Important Geographical Variation Between Northern and Southern Lands and High Mortality Versus European Averages. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 52(1), 222–228. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00382-3>
11. Kehl, A., Törner, K., Jordan, A., Lorenz, M., Schwittlick, U., Conrad, D., Steiger, K., Schusser, B., & Aupperle-Lellbach, H. (2022). Pathological Findings in Gastrointestinal Neoplasms and Polyps in 860 Cats and a Pilot Study on miRNA Analyses. *Veterinary Sciences*, 9(9), 477. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090477>
12. Mak, I. W., Evaniew, N., & Ghert, M. (2014). Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. *American Journal of Translational Research*, 6(2), 114–118.
13. Marconato, L., Gelain, M. E., & Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human

- non-Hodgkin lymphoma: A review. *Hematological Oncology*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/hon.2017>
14. Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022). The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *eClinicalMedicine*, 47, 101404. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101404>
15. Munday, J. S., Löhr, C. V., & Kiupel, M. (2016). Tumors of the Alimentary Tract. În D. J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals* (1 ed, pp. 499–601). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch13>
16. Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I., & Johnson, G. F. (1977). Canine Gastrointestinal Neoplasms. *Veterinary Pathology*, 14(6), 547–555. <https://doi.org/10.1177/030098587701400602>
17. Saito, T., Nibe, K., Chambers, J. K., Uneyama, M., Nakashima, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., Uchida, K., & Nakayama, H. (2020). A histopathological study on spontaneous gastrointestinal epithelial tumors in dogs. *Journal of Toxicologic Pathology*, 33(2), 105–113. <https://doi.org/10.1293/tox.2019-0076>
18. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
19. Taulescu, M.A.; Valentine, B.A.; Amorim, I.; Gärtner, F.; Dumitrascu, D.L.; et al. (2014), Histopathological features of canine spontaneous non-neoplastic gastric polyps—a retrospective study of 15 cases. *Histol. Histopathol.*, 29(1), 65–75. <https://doi.org/10.14670/HH-29.65>
20. Uneyama, M., Chambers, J. K., Fujii, T., Nakashima, K., & Uchida, K. (2024). Establishment and characterization of a novel cell line and xenotransplant mouse model derived from feline colorectal adenocarcinoma. *Veterinary Pathology*, 61(2), 190–200. <https://doi.org/10.1177/03009858231189858>
21. Vuik, F. E., Nieuwenburg, S. A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M. J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M. F., Suchanek, S., Ngo, O., Májek, O., Leja, M., Kuipers, E. J., & Spaander, M. C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, 68(10), 1820–1826. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317592>
22. Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 14(10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>