

REZUMAT

Cuvinte-cheie: Apoptoză; Bovine; BPV; Fibropapilom; Hiperproliferare.

Creșterea rumegătoarelor mari se confruntă la nivel mondial cu o importantă provocare infecțioasă bacteriană și virală, responsabilă de apariția a numeroase afecțiuni la nivelul pielii sau mucoaselor care pot determina, la rândul lor, importante pierderi economice crescătorilor (ex. deprecierea calității pieilor destinate industriei marochinăriei, subdezvoltarea animalelor, pierderea în greutate sau scăderea producției de lapte). Una din aceste afecțiuni cu impact economic este reprezentată de infecția cu papillomavirusurile bovine (BPV). Pe lângă importanța aspectelor veterinare, infecției cu BPV la bovine îi este conferită o semnificație medicală, aceasta fiind reprezentată de utilizarea în mod extensiv ca și model animal în studierea carcinogenezei virale. Deși majoritatea sistemelor experimentale de până acum au studiat *in vitro* transformarea celulară indusă de papillomavirusurile umane (HPV), primele observații privind mecanismele celulare din timpul transformării celulare induse de către papillomavirusuri au fost furnizate de studii realizate pe BPV-1 (Campo, 1992). Astfel ADN-ul BPV-1 prezintă o proprietate biologică unică, aceasta constând în abilitatea de a transforma morfologic și a se replica în culturi celulare de șoarece. Această proprietate a însemnat că BPV a devenit cel mai studiat model bazat pe un papillomavirus animal necesar în înțelegerea potențialului oncogenic al acestor virusuri (Lowy și colab, 1980). Drept consecință a numeroaselor studii realizate de-a lungul anilor, rezultatele obținute în urma analizei mecanismelor virale în infecțiile cu BPV, dar și a transformării celulare, au oferit numeroase cunoștințe prețioase în ceea ce privește această infecție la om. Referitor la papillomavirusurile bovine, acestea sunt virusuri cu potențial oncogenic, capabile să infecteze atât epitelul cutanat, cât și cel al mucoaselor la bovine. Spectrumul gazdelor infectate de BPV, dar și tropismul specific al fiecărui tip viral sunt bine stabilite; însă, în ultimii ani, acest virus a reușit să rupă această „paradigmă”, întrucât diferite tipuri neobișnuite au fost identificate în localizări neobișnuite și la specii neobișnuite (Lohr și colab, 2005; Literak și colab, 2006;

Kidney și Berrocal, 2008; Nasir și Campo, 2008; Silvestre și colab, 2009; Pangty și colab, 2010; van Dyk și colab, 2011; Bam și colab, 2012; Kumar și colab, 2013; Lunardi și colab, 2013). De aceea, epidemiologia și specificitatea de specie a BPV par să se schimbe cu rapiditate, iar numeroase aspecte noi sunt emergente. Este de așteptat, ca în câțiva ani, mult mai multe tipuri noi să fie identificate, mai ales cu noile biotehnologii de vârf existente în medicină (Bocaneti și colab, 2014).

Teza de doctorat intitulată „**Incidența și diagnosticul infecțiilor cu papillomavirus la bovine**” cuprinde 175 pagini, fiind redactată în XIII capitole și este structurată conform criteriilor în vigoare, în două părți: prima parte (29 pagini), și partea a doua (90 pagini), la care se adaugă cuprinsul, introducerea, rezumatul și bibliografia tezei de doctorat.

Prima parte „**Stadiul actual al cunoașterii**” este structurată în 4 capitole care sintetizează principalele date din literatura de specialitate cu privire la infecțiile cu papillomavirusuri de la bovine.

Partea a doua „**Cercetări proprii**” este structurată în 9 capitole, care prezintă scopul și obiectivele cercetărilor, rezultatele investigațiilor privind infecția cutanată cu papillomavirusuri a bovinelor, materialele și metodele de lucru utilizate, interpretarea și discutarea rezultatelor, dar și concluziile și recomandările desprinse consecutiv cercetărilor realizate.

Lucrarea este ilustrată cu un număr de 62 figuri și 15 tabele.

Pentru documentarea științifică s-au utilizat 263 titluri bibliografice din literatura de specialitate națională și internațională.

Prima parte a lucrării reprezintă o sinteză a literaturii referitoare la papilomatoza bovinelor, cu aspecte asupra importanței pentru cercetarea medicală, precum și asupra stadiului actual al cunoașterii pe plan internațional.

❖ *Capitolul I*, intitulat, „**Date bibliografice privind istoricul și etiologia infecțiilor cu papillomavirusuri la bovine**” prezintă datele disponibile la ora actuală privind papillomavirusurile. Sunt trecute în revistă istoricul și evoluția papillomavirusurilor, etiologia lor complexă, cât și taxonomia și rolul proteinelor virale.

❖ *Capitolul II*, intitulat „**Caracterele epizootologice și mecanismul patogenetic în infecția cu papillomavirusuri la bovine**” descrie caracteristicile infecțiilor cu papillomavirusuri la bovine, dar și mecanismul patogenetic complex.

❖ *Capitolul III*, intitulat „**Tabloul clinic și anatomopatologic în infecțiile cu papillomavirusuri la bovine**” tratează principalele aspecte lezionale induse de papillomavirusurile bovine .

❖ Capitolul IV, intitulat „**Diagnosticul, profilaxia și combaterea în infecțiile cu papillomavirusuri la bovine**” prezintă metodologia diagnosticului de laborator, ca și măsurile de supraveghere și control ce se impun efectivele de bovine.

Partea de cercetări proprii cuprinde șase capitole:

❖ *Capitolul V* redă „**Scopul și obiectivele cercetărilor**”.

Cercetările de față își propun realizarea unei anchete epidemiologice în vederea stabilirii unei prevalențe fidele a bolii în efective de bovine din zona de est a Moldovei, realizarea unui examen clinic și stabilirea trăsăturilor anatomo-clinice, dar și a celor morfopatologice. De asemenea, cercetările au avut ca și obiectiv identificarea și caracterizarea tipurilor virale incriminate în apariția formațiunilor tumorale de la nivel cutanat prin studii de biologie moleculară. Dată fiind natura proliferativă a leziunilor induse de aceste virusuri oncogenice, s-a recurs la determinarea gradului de proliferare al tumorilor cutanate. Nu în ultimul rând, un obiectiv foarte important avut în vedere a fost reprezentat de studierea unor mecanisme intracelulare, dar și a unor proteine implicate în transformarea celulară suferită de celula-gazdă infectată.

❖ *Capitolul VI* intitulat „**Investigații epidemiologice, anatomo-clinice și morfopatologice în infecția cu papillomavirus la bovine**” redă investigațiile epidemiologice, anatomo-clinice și morfopatologice realizate în perioada 2010-2014. Animalele examinate și de la care s-au recoltat probe biologice provin din diverse ferme de creștere a bovinelor și din gospodării ale populației, din zona de est a României. Astfel, din totalul de 2127 de animale examinate, un număr de 305 bovine cu vârsta cuprinsă între 0 și 6 ani au prezentat leziuni consecutiv infecției cu papillomavirusul bovin, ceea ce reprezintă o incidență de 14.34%. Un număr mai mare de îmbolnăviri a fost înregistrat în sistemul de creștere intensiv, apariția bolii fiind favorizată de condițiile precare de igienă, supraaglomerare, existența microleziunilor, anotimp, dar și de statusul imun, față de gospodăriile populației, unde s-au înregistrat doar cazuri sporadice. Cel mai însemnat procent de îmbolnăviri s-a înregistrat la categoria de vârstă cuprinsă între 6-12 luni (4.94%), urmată de categoria 12-18 luni (3.9%). Boala poate fi corelată cu vârsta: cel mai mare număr de îmbolnăviri se înregistrează în jurul vârstei de 12 luni (34,43%), după care se observă o scădere a numărului odată cu înaintarea în vârstă a bovinelor (>18 luni – 16.72%). Din punct de vedere al localizării leziunilor, la animalele cu vârsta cuprinsă între 4 luni și 18 luni, cea mai întâlnită localizare cutanată a papiloamelor a fost la nivelul capului, periocular și periauricular, (50%), iar la bovinele adulte, peste 24 de luni, indiferent de sistemul de exploatare, aflate în lactație, s-a putut observa o localizare a papiloamelor la nivelul pielii glandei mamare (9.51%). Referitor la aspectele morfopatologice, la nivelul pielii s-au constatat formațiuni conopidiforme, hiperkeratozice, de culoare gri-albicioasă, cu diametrul cuprins între 2-15 cm. Examinarea

histopatologică constituie o metodă de primă elecție, iar diagnosticul se poate pune cu ușurință datorită aspectelor anatomo-clinice, leziunile produse de aceste virusuri fiind caracteristice și de mare ajutor pentru a putea face o diferențiere corectă față de alte boli ale pielii cu caracter tumoral. Consecutiv acestui examen, tumorile cutanate analizate s-au caracterizat printr-o hiperplazie epidermică cu acantoză (hiperplazia stratului spinos), parakeratoză (keratinizare incompletă cu păstrarea nucleilor picnotici în stratul cornos) și prin hiperkeratoză ortokeratotică (îngroșarea stratului cornos prin celule keratinizate, anucleate). Prezența koilocitelor grupate în stratul spinos și granular indică prezența unei infecții cu papillomavirus.

❖ *Capitolul VII* intitulat „**Cercetări privind identificarea și caracterizarea genotipurilor de papillomavirusuri din papilomatoza cutanată la bovine**” redă importanța tehnicilor de biologie moleculară în identificarea și caracterizarea papillomavirusurilor bovine implicate în etiologia papiloamelor cutanate. Consecutiv testării unui număr de 24 de probe (20 fiind reprezentate de țesuturi tumorale și 4 probe de țesut cutanat), în 18 probe (90%) tumorale și în 3 din 4 probe reprezentate de țesut cutanat sănătos a fost amplificată gena L1-BPV-1. Pentru identificarea ADN-ului BPV-2 s-au utilizat două seturi de primeri, primul set (specific pentru gena E5) a amplificat gena E5 BPV-2 în toate cele 20 probe de țesut tumoral testate (100%) și în 3 din cele 4 probe reprezentate de țesut cutanat normal, în timp ce al doilea set de primeri (specific pentru gena E2), gena E2 BPV-2 a fost identificată în 10 din cele 20 de tumori și în 2 din cele 4 probe reprezentate de țesut cutanat normal. Astfel, din totalul de 24 probe testate, 21 (87.5%) de probe au fost pozitive pentru BPV-1, în timp ce 23 (95.8%) din probe au fost pozitive pentru BPV-2. Prezența co-infecției s-a înregistrat la un număr de 21 de cazuri (87.5%). În ceea ce privește rezultatele utilizării primerilor care amplifică genele timpurii E2 și E5, acesta din urmă s-a dovedit a fi mai sensibil în a identifica probele pozitive pentru BPV-2. De asemenea, pozitivitatea probelor de țesut cutanat recoltate de la animale aparent sănătoase ar putea fi explicată prin existența unor infecții vechi, actualmente aflate în stare latentă, fie de existența unor infecții active, dar la nivel esofagian, ruminal sau al vezicii urinare, în care virusul s-ar afla în circulația sangvină prin intermediul limfocitelor circulante.

O altă tehnică utilă în diagnosticul infecției cu papillomavirusuri bovine este reprezentată de imunofluorescența indirectă. Astfel, un număr de 11 probe reprezentate de fibropapiloame cutanate și 4 probe reprezentate de țesut cutanat normal provenite de la animale sănătoase au fost testate prin această metodă, urmărind prezența proteinei E5, principala oncoproteină a BPV. Proteina E5 a fost identificată în toate probele tumorale, nu însă și în probele reprezentate de țesut cutanat normal. E5 a fost exprimată în cantități crescute în stratul bazal și granular, fiind sporadic exprimată în stratul spinos, în timp ce în interiorul celulelor neoplazice, proteina a fost raportată cel mai frecvent intracitoplasmatic, adesea având o localizare caracteristică,

juxtannucleară. Referitor la utilitatea oncoproteinei E5, aceasta poate fi folosită ca un marker pentru o infecție productivă cu BPV.

❖ *Capitolul VIII* se intitulează „**Evaluarea indicelui proliferativ în fibropapiloame cutanate bovine**”. Dat fiind caracterul proliferativ specific infecțiilor cu papillomavirusuri, cercetările își propun determinarea indicelui proliferativ (IP) al formațiunilor cutanate tumorale pozitive față de BPV. Astfel, după analiza imunohistochimică a marker-ului PCNA și stabilirea indicilor pentru fiecare leziune, s-au obținut un IP maxim de 98.3% și unul minim de 77.66%. O parte din probele analizate se caracterizează printr-o rată crescută de proliferare a celulelor din straturile bazale, spinos și granular, spre deosebire de probele de țesut cutanat normal caracterizate printr-o proliferare a celulelor din straturile bazale.

❖ *Capitolul IX*, intitulat „**Cercetări privind expresia unor molecule implicate în mecanismul tumoral din fibropapiloame cutanate bovine**” urmărește analiza prin metode de biologie moleculară (imunohistochimie și Western Blot) a receptorului PDGFβ și gradul acestuia de fosforilare, dar și a proteinelor pAkt și pErk prezente în fibropapiloame cutanate induse în mod natural de BPV. Cu ajutorul tehnicii imunohistochimice s-a evaluat în secțiuni seriale o posibilă co-exprimare a proteinei E5 și a receptorului PDGFβ în interiorul aceluiași celule din fibropapiloame. Consecutiv, în majoritatea celulelor neoplazice din toate probele analizate s-a constatat o co-expresie citoplasmatică a receptorului PDGFβ și a proteinei E5, sugerând o posibilă interacțiune fizică. Analizând statusul receptorului total dar și a celui fosforilat (activat), valoarea densitometrică medie a probelor reprezentate de țesut cutanat normal comparată cu valoarea medie obținută de la cele cinci fibropapiloame, nu a arătat o diferență semnificativă a nivelului de expresie a receptorului PDGFβ; în schimb receptorul PDGFβ a fost fosforilat într-o proporție mai mare în tumori comparativ cu pielea sănătoasă, diferența între cele două medii (normal vs. fibropapilom) fiind semnificativă din punct de vedere statistic. Din analiza moleculelor din avalul căii de semnalizare a receptorului PDGFβ, nu s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește gradul de fosforilare a proteinei pErk din tumori raportat la pielea sănătoasă; în trei din cele cinci tumori testate: (F2, F3, F5) s-a constatat supraexprimare clară a pAkt. Însă din punct de vedere statistic nu s-a observat o diferență semnificativă între probele normale și cele tumorale. Drept consecință, se poate specula că dereglarea activității acestor proteine ar putea fi consecința activării receptorului PDGFβ de către E5 în celulele în care aceste două proteine sunt co-exprimate.

Capitolul X intitulat „**Cercetări privind expresia proteinelor mediatore ale apoptozei bcl-2 și p53 în fibropapiloame cutanate bovine**” prezintă rezultatele obținute în urma analizei imunohistochimice și biochimice a proteinei anti-apoptotice bcl-2 și a supresorului tumoral p53 din fibropapiloame cutanate bovine, BPV-1/-2 pozitive. Pentru a verifica specificitatea anti-

corpilor utilizați în recunoașterea specifică a antigenelor bcl-2 și p53 din țesuturi, aceștia au fost testați inițial prin tehnica Western blot aplicată pe proteinele totale extrase din probele respective. Analiza biochimică a confirmat specificitate anticorpilor, lucru demonstrat și de apariția benzilor specifice de greutate moleculară cunoscută (bcl-2=25 kDa; p53=53 kDa) în probele constituind martorii pozitivi HEK (Human Embryonic Kidney) 293 și HeLa. Prin tehnica imunohistochimică s-a urmărit caracterizarea colorației specifice pentru cele două proteine. Astfel, din cele 12 probe tumorale, 9 probe (75%) au fost caracterizate printr-un semnal pozitiv față de proteina bcl-2 în celulele din stratul bazal și parabazal ale epitelului. Fibroblastele din derm nu au prezentat o imunoreactivitate specifică față de bcl-2, în timp ce țesutul cutanat normal a fost caracterizat printr-o reacție slab pozitivă față de bcl-2, limitată la nivelul celulelor din stratul bazal. Majoritatea celulele imunopozitive din straturile bazale și parabazale au prezentat o imunoreactivitate de intensitate puternică la nivel citoplasmatic și membranar. Mai departe, prin tehnica TUNEL s-a determinat indexul apoptotic pentru probele pozitive și negative față de expresia bcl-2, cu scopul de a verifica dacă expresia proteinei bcl-2 ar putea influența rata de supraviețuire a celulelor tumorale. În fibropapiloamele bcl-2-negative s-a obținut un indice apoptotic (IA) de 43.6% (± 5.2), în timp ce în probele bcl-2 pozitive s-a obținut un IA de 37.1% (± 2.57). Analizând expresia proteinei p53 în probele reprezentate de țesut cutanat normal, prin tehnica imunohistochimică s-a observat o expresie redusă și limitată în citoplasma celulelor din stratul bazal. Astfel, din cele 12 probe tumorale analizate, nouă (75%) probe au exprimat proteina p53, fiind considerate pozitive, detectându-se o expresie puternică a proteinei p53 în stratul bazal al epitelului, dar și în stratul parabazal învecinat. Prezența celor două proteine ar putea explica o posibilă contribuție a expresiei bcl-2 în susținerea supraviețuirii celulelor neoplazice, cel mai probabil prin intermediul unei expresii modificate a proteinei p53.

❖ **Capitolul XI**, cu titlul „**Cercetări privind expresia enzimei ciclooxigenaza-2 în fibropapiloame cutanate bovine**” a analizat expresia enzimei ciclooxigenaza-2, enzimă implicată în diferite procese fiziologice prin catalizarea și conversia acidului arahidonic în lipide bioactive, fiind asociată în principal cu reacțiile inflamatorii și cu dezvoltarea unor diferite tipuri de cancer. Analizând imunohistochimic probele reprezentate de formațiuni cutanate tumorale și piele sănătoasă, s-a constatat expresia enzimei în opt probe tumorale (67%) din cele 12 testate. În timp ce în probele reprezentate de țesut cutanat normal nu s-a identificat o imunoreactivitate specifică, în cele tumorale imunosemnalul specific s-a identificat în citoplasma celulelor din stratul bazal, cu o intensitate crescută în zona perinucleară, ceea ce ar sugera o contribuție din partea enzimei în dezvoltarea tumorilor epiteliale.

❖ **Capitolul XII**, intitulat „**Considerații generale privind profilaxia și combaterea în infecțiile cutanate cu papillomavirusuri bovine**”, descrie pe scurt măsurile necesare de

profilaxie ce se impun pentru menținerea indemnității efectivelor de bovine, dar și măsurile de combatere eficiente, acolo unde sunt prezente cazuri clinice. Nu trebuie omisă importanța actului chirurgical pentru un tratament corect și pentru îndepărtarea surselor principale de infecție.

❖ *Capitolul XIII* prezintă succint un număr de 17 concluzii finale, iar pe baza datelor furnizate de rezultatele cercetărilor, sub raportul stabilirii unui diagnostic de certitudine, s-a recomandat o strategie de diagnostic de laborator.