

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”  
BUCUREȘTI

**TESTE INOVATIVE ÎN PATOLOGIA MALIGNĂ  
COLORECTALĂ, UN PAS CĂTRE TRATAMENTUL  
INDIVIDUALIZAT**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:

PROF. UNIV. DR. Daniela Galieta Mincă

DOCTORAND:

ALEXANDRU CHIRCA

## Cuprins

<b>Introducere .....</b>	<b>3</b>
<b>Studiu personal.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Obiective .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Material și metode.....</b>	<b>6</b>
<b>Metodologia lucrării:.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Rezultate și discuții .....</b>	<b>7</b>
<b>4. Concluzii .....</b>	<b>17</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>20</b>

## Introducere

În ultimul secol speranța de viață la nivel mondial a cunoscut o creștere semnificativă datorită, printre altele, accesului tot mai facil la sisteme de sănătate care au îmbunătățit rata de diagnostic și de tratament a multor boli. Totuși, în această perioadă în care metodele de tratament s-au diversificat, mortalitatea determinată de neoplasme s-a înscris - și se menține și în prezent - pe un curs ascendent cu o creștere de aproximativ 40% în ultimii 40 de ani și o creștere estimată pentru anul 2030 de circa 60% (aproximativ 13 milioane de persoane) (1).

În ceea ce privește cancerul colorectal situația este și mai îngrijorătoare. Introducerea programelor de screening populațional și evoluția metodelor terapeutice au avut un impact major asupra incidenței și a mortalității determinate de acest tip de cancer având în vedere că la jumătatea secolului trecut cancerul colorectal reprezenta o afecțiune rară. Astăzi, deși programele de screening au evoluat și s-au diversificat iar metodele de diagnostic și tratament sunt tot mai eficiente, cancerul colorectal rămâne una dintre cele mai frecvente forme de cancer din țările dezvoltate (2). Creșterea incidenței în statele cu standarde de viață înalte este corelată cu creșterea speranței de viață și are ca determinanți o serie de factori de risc asociați regimului alimentar inadecvat, activității fizice tot mai reduse, obezității, fumatului, consumului de alcool, ritmului de viață dinamic și stresului. Acești factori de risc au crescut incidența cancerului colorectal atât în formele sporadice de boală cât și în unele forme de neoplasme familiale, iar progresele terapeutice, deși impresionante, nu au determinat încă o creștere semnificativă a ratei de vindecare și supraviețuire pe termen lung (2).

Scopul acestui studiu a fost de a prezenta o altă perspectivă a modalității prin care se poate realiza un diagnostic precoce și totodată un tratament personalizat la pacienții cu neoplasm colorectal. Acestea pot fi realizate prin evaluarea prezenței unor profiluri genetice asociate cu risc crescut de a dezvolta CCR și cu responsivitatea pacienților la tratamentele oncologice în continuă dezvoltare, profiluri care pot fi evidențiate prin genotiparea de polimorfisme uninucleotidice utilizând metoda rtPCR, la pacienții cu sau fără CCR, în cele din urmă fiind necesară stabilirea unor corelații și asocieri între acestea și alte variabile clinico-patologice.

Trebuie menționat că la nivel mondial există studii recente efectuate în acest domeniu însă acest studiu este primul care are la bază un lot omogen reprezentat de o populație din România.

În prima parte a lucrării – partea generală – sunt descrise în detaliu mecanismele care conduc la formarea neoplasmului colorectal, punându-se accent pe căile moleculare de carcinogeneză, metode de diagnostic, tratament chirurgical și oncologic în diverse stadii de

evoluție a bolii. De asemenea, sunt detaliate mecanismele cardiotoxicității principalelor clase de agenți chimioterapici utilizați în tratamentul oncologic al cancerului colorectal. Ultimul capitol al acestei părți își îndreaptă atenția către unitățile de variație genică reprezentate de polimorfismele uninucleotidice și importanța lor în patologia oncologică precum și în farmacocinetica și farmacodinamica medicamentelor. Sunt enumerate diverse metode moleculare care au ca scop identificarea polimorfisemlor uninucleotidice și este exemplificată metoda utilizată și anume genotiparea prin rtPCR (endpoint genotyping).

În cea de a doua parte a lucrării – partea specială – este prezentată contribuția personală. Sunt descrise pe larg obiectivele studiului, criteriile de includere și excludere a pacienților în studiu, important de menționat fiind faptul că au fost excluși toți pacienții care au prezentat orice fel de tulburare cardiacă care ar putea conduce la rezultate eronate în ceea ce privește evaluarea cardiologică prin ecocardiografie de înaltă performanță post-chimioterapie. Ulterior, au fost prezentate datele înregistrate pentru fiecare participant la studiu, metodele prin care au fost investigați pacienții incluși în studiu și au fost descrise cele două loturi de studiu. În cele din urmă au fost prezentate rezultatele, comparate cu datele din literatura de specialitate și argumentate în capitolul dedicat discuțiilor, la final fiind prezentate concluziile studiului.

Cardiotoxicitatea reprezintă un important efect advers care poate limita doză terapeutică a multor agenți antineoplazici utilizați. Identificând precoce aceste efecte adverse se poate preveni afectarea cardiacă ireversibilă și morbiditatea pe termen lung. Deși cardiotoxicitatea se poate manifesta și fără prezența altor factori predispozanți, numeroși factori de risc cunoscuți trebuie luați în considerare în momentul administrării tratamentului (3).

Cardiotoxicitatea identificată încă din anii 60, este definită destul de ambiguu de Institutul Național American pentru cancer ca „toxicitatea care afectează inima” (4). Aceasta a fost definită în urma unui consens multimodal de evaluare imagistică în timpul tratamentului chimioterapic la 2-3 săptămâni după inițierea tratamenului oncologic, ca o disfuncție cardiacă manifestată prin scăderea fracției de ejeție a ventriculului stâng (FEVS) cu mai mult de 10% până la o valoare de sub 53% (5).

Floropirimidinele precum fluorouracilul și capecitabina reprezintă principalele chimioterapeutice utilizate în tratamentul oncologic al tumorilor solide localizate la nivelul colonului și al rectului (6). Acestea, în funcție de doză și numărul de cicluri pot induce o serie de efecte toxice, printre care și cardiotoxicitate (7). Cardiotoxicitatea indusă de floropirimidine a fost raportată pentru prima oară în anul 1969, iar în prezent aceasta reprezintă un efect advers rar întâlnit dar cu potențial letal (8). Marea majoritate a acestor manifestări cardiotoxice (angină

pectorală, aritmii, hipertensiune arterială, infarct miocardic și chiar șoc cardiogen) sunt observate în timpul primului ciclu de tratament, iar prezența lor are ca rezultat oprirea tratamentului chimioterapic (9).

Polimorfismele uninucleotidice (SNP) reprezintă cel mai frecvent tip de variație genetică la om și constau în diferențe între o singură bază nucleotidică care intră în componența ADN-ului cu schimbarea a două nucleotide la o poziție dată.

Polimorfismele uninucleotidice au o incidență crescută și sunt strâns legate de variantele genetice implicate în anumite afecțiuni (10). Majoritatea acestor polimorfisme nu influențează starea de sănătate, nefiind implicate în mecanisme moleculare specifice, deși s-a demonstrat că sunt foarte importante în studiul acestora. Atunci când aceste variații de o singură bază nucleotidică au loc la nivelul unei gene sau la nivelul unei regiuni codante ale unei gene, pot avea un rol direct în apariția unor afecțiuni prin alterarea funcției genei respective. SNP pot acționa ca predictorii în ceea ce privește susceptibilitatea de a dezvolta o anumită afecțiune și răspunsul la un tratament specific. Datorită cercetării active în acest domeniu și a multitudinii de teste populaționale de asociere genică, aceste variații vor fi utilizate în viitorul apropiat ca markeri moleculari specifici bolilor complexe precum neoplaziile, afecțiunile cardiace și neurologice (11).

În ansamblu, genotiparea polimorfismelor uninucleotidice, prin rezultatele și reproductibilitatea de care dă dovadă reprezintă o metodă tot mai utilizată în ceea ce privește diagnosticul precoce și tratamentul individualizat.

## **Studiu personal**

### **1. Obiective**

#### **Obiectivul principal**

Identificarea prezenței unor profiluri genetice asociate cu risc crescut de a dezvolta CCR, și descrierea asocierii între acestea și alte variabile clinico-patologice.

#### **Ipotezele studiului:**

- Există o asociere între un anumit profil genetic reprezentat de polimorfismele uninucleotidice rs6983267, rs4779584, rs2273535, rs719725, rs1801131, rs9344.
- Există o relație între tratamentul chimioterapic și efectul cardiotoxic al acestuia.

- Există un model de factori agregați care se asociază evoluției bolii pentru pacienții diagnosticați cu CCR. Lista acestora include caracteristici personale (gen, vârstă), de tip de afectare tumorală (localizare, formă histopatologică) aspecte ale managementului bolii (intervalul de timp de la diagnosticare la administrarea tratamentului, durata de internare, complicațiile postoperatorii)

### **Subobiective:**

- Evaluarea corelațiilor între stadiul, gradul de diferențiere al tumorii, localizarea și tipul histopatologic al neoplasmului, invazia ganglionară și tipul de intervenție chirurgicală la pacienții cu CCR
- Analiza asocierii între diferiți parametrii paraclinici precum analizele de laborator, dimensiunile tumorii și ecografia cardiacă pre/postchimioterapie la pacienții cu CCR.
- Descrierea supraviețuirii și recurenței bolii neoplazice colo-rectale la un an în cazul lotului studiat
- Testarea unui protocol de genotipare cost-eficient bazat pe tehnica rtPCR
- Inițierea unei baze de date care să fie integrată și comparată cu bazele de date internaționale

## **2. Material și metode**

### **Metodologia lucrării:**

Cercetarea de față și-a propus o abordare complexă multidisciplinară. Abordarea de fond este reprezentată de un studiu prospectiv istoric. În cadrul acestuia s-au selectat un lot de cazuri constituit din 32 de pacienți cu cancer colorectal, și un lot martor reprezentat de 32 de persoane fără cancer colorectal. Abordarea prospectivă a acoperit 18 luni de la constituirea loturilor de studiu.

Populația de studiu este reprezentată de 75 de pacienți internați în clinica chirurgie II SUUB în intervalul 2015-2017. Dintre aceștia, în urma aplicării criteriilor de includere și excludere la final au rămas 32.

Grupul martor a inclus tot 32 de persoane care nu aveau diagnosticul de cancer colorectal pentru a fi cât mai asemănător grupului de cazuri din punct de vedere gen, vârstă, absența unor patologii cardiace preexistente.

Pacienții din lotul de studiu au fost investigați conform protocolului intraspitalicesc pentru pacientul cu neoplasm colorectal. Aceștia au beneficiat de investigații de laborator

biologic și histopatologic (hemogramă, bichimie , coagulogramă, dozarea markerilor tumoral CEA și CA19-9 și analiza histologică și imunohistochimică a pieselor de rezecție unde a fost cazul) investigații imagistice (ecografie abdominală, examinare CT abdomino-pelvină, endoscopie digestivă inferioară).

Pacienții incluși în studiu au beneficiat în plus de investigații imagistice (ecografie cardiacă transtoracică) și de laborator de biologie moleculară (extracție, cuantificare de acizi nucleici și genotiparea de polimorfisme uninucleotidice).

Datele actuariale, cele referitoare la caracteristicile clinice ale celor două loturi și cele obținute prin intermediul investigațiilor prezentate anterior sunt introduse într-o bază de date și analizate statistic prin intermediul softurilor dedicate pentru statistică Medcalc 14.12.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) și NCSS 10 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA).

Pentru a determina tipul de distribuție al variabilelor continue s-a folosit testul D'Agostino-Pearson. În funcție de tipul de variabilă rezultatele au fost exprimate astfel:

- Pentru variabilele cu distribuție normală – ca medie și deviație standard
- Pentru variabilele cu distribuție non-normală – ca mediană și percentilele 25 și 75.

În cazuri selectate, pentru anumite variabile numerice, rezultatele se vor exprima atât ca medie și deviație standard cât și ca mediană întrucât numărul mic de pacienți din anumite subgrupuri impune utilizarea unor teste non-parametrice.

Pentru a face comparație între variabilele cu distribuție normală vom folosi Testul t-Student (t-test) și ANOVA, în funcție de numărul de grupuri studiate, iar pentru cele cu distribuție non-gaussiană, testele Wilcoxon-Mann-Whitney sau Kruskal-Wallis.

Stabilirea existenței unei asocieri între variabilele categoriale va fi realizată prin utilizarea testului Pearson's Chi-Squared ( $\chi^2$ ) sau testul Fisher, în funcție de numărul de cazuri.

Pentru a stabili gradul de corelație între variabilele numerice vom folosi coeficientul de corelație Spearman a ordinii rangurilor. În funcție de valorile acestui coeficient gradul de corelație este apreciat astfel: pentru valori între 0.00 și 0.19 corelație foarte slabă, între 0.20 și 0.39 corelație slabă, pentru valori între 0.40 și 0.59 corelație moderată, pentru valori între 0.60 și 0.79 corelație puternică.

### **3. Rezultate și discuții**

Vârsta medie la diagnostic a pacienților din lotul de studiu a fost de 68.03 ani, mai mică decât vârsta medie la diagnostic raportată în alte țări europene (72-75 ani) pentru cancer colorectal sporadic iar cea din lotul martor a fost de 66 de ani (12).

În lucrarea noastră durata spitalizării a fost 16.5 zile (25-75 IQR 12-22 zile) chiar dacă trendul în țări europene și în Statele Unite este de a reduce durata de la intervenția chirurgicală până la externare cu cât mai mult posibil.

<b>Tabelul 1.</b> Datele demografice și caracteristicile ale celor două loturi de pacienți.			
	<b>Lotul Caz (n=32)</b>	<b>Lotul Martor (n=32)</b>	<b>Valoarea p</b>
<b>Date demografice</b>			
Vârsta (ani)	67.0 ± 7.17	66.0 ± 13.8	ns
Sex			ns
Masculin	17 (53.13%)	17 (53.13%)	
Feminin	15 (46.88%)	15 (46.88%)	

În studiul de față am identificat o mediană de la debutul simptomatologiei până la diagnostic de opt luni (25-75 IQR = 5.5 – 11) luni și o mediană a acestui interval de șapte luni pentru pacienții de sex feminin și opt luni pentru pacienții de sex masculin. Mediana de la internare la momentul intervenției chirurgicale a fost de 4 zile, 25-75 IQR = 2.7 – 7 zile, mult mai scurtă decât cea raportată în literatură, cu doar șapte decese care în studiul nostru au fost cauzate de factori legați de neoplazia colorectală .

S-a descoperit o corelație între durata de la debutul simptomatologiei până la diagnostic și nivelul seric al antigenului carcinoembrionar, al cărui nivel este strâns legat de stadiul tumoral, așa cum rezultă din diverse studii și meta-analize. Astfel, o durată mai lungă a simptomatologiei corespunde unui stadiu avansat al bolii și prezintă valori crescute ale acestui marker (13). În aceeași manieră nivelul seric al CA19-9 s-a corelat cu durata de la debutul simptomatologiei până la diagnostic.

Când a fost evaluată relația dintre valorile CA19-9 și numărul de ganglioni limfatici invadați, rezultatele noastre au fost similare cu cele raportate în literatură și au arătat o diferență semnificativ statistic între nivelul seric de CA19-9 și prezența sau absența metastazelor ganglionare (14).

Sindromul inflamator poate asigura condiții necesare dezvoltării unei neoplazii. Orice tip de inflamație determinată de un control slab al răspunsului imun poate perturba mediul celular și poate conduce la alterări ale funcționării genelor implicate în patogeneza malignă precum și modificări post-tranlaționale la nivelul unor proteine cu rol în ciclul celular,



repararea de ADN și apoptoză (15). Sindromul inflamator reprezentat de creșteri ale fibrinogenului și VSH a fost prezent la marea majoritate a pacienților din lotul de studiu (n=29) dar în același timp este nespecific.

Anemia, sau mai degrabă sindromul anemic, reprezintă o caracteristică a cancerului colorectal fiind prezent în medie între 11-57% din cazurile diagnosticate și în principiu este sugestivă pentru tumorile cecale (16). De asemenea, pacienții care prezintă anemie de obicei au un stadiu mult mai avansat și o mortalitate mai mare decât cei care nu o prezintă (17). Analizând prezența unui sindrom anemic în lotul de studiu, am descoperit că 21 de pacienți au avut un nivel al hemoglobinei la diagnostic de sub 12g/dL. Toți pacienții care au avut tumori localizate la nivelul colonului drept au prezentat un sindrom anemic.

Studiul nostru a descoperit o durată a spitalizării mai mare decât cea raportată în literatură pentru patologia neoplazică colorectală ( 17 vs 10 zile) (18), durată care a fost influențată de mai multe variabile precum durata simptomatologiei, stadializarea tumorală, durata și tipul intervenției chirurgicale precum și infecția post-operatorie cu Clostridium difficile. De asemenea, acest interval a fost independent de alte variabile precum comorbidități cardiace, nivelul hemoglobinei sau al albuminei și proteinelor totale.

<b>Tabelul 2. Caracteristicile lotului caz</b>			
Interval debut simptome-diagnostic (luni)	8 (5.5; 11)		
Durata spitalizării (zile)	17 (12; 22)		
Interval internare – intervenție (zile)	4 (2.7; 7)		
Durata spitalizare în ATI (zile)	1 (1; 2)		
Durata intervenției chirurgicale (minute)	240 (195; 288.75)		
Durata moment intervenție – tratament oncologic (zile)	64.5 (56; 75)		
CEA (ng/ml)	18.15 (8; 47)		
CA19-9 (U/ml)	86 (62.5; 227.4)		
Sindrom inflamator	29 (90.6%)		
Sindrom anemic	21 (65.6%)		

Mai mult de 90% din totalitatea rezultatelor histopatologice au identificat adenocarcinom NOS de colon sau rect ca fiind cel mai comun tip histologic în patologia colorectală, urmat de cel mucinos (19). Pacienții incluși în lotul de studiu au prezentat cel mai frecvent adenocarcinom de colon și rect (n=31) un singur pacient prezentând o componentă mixtă mucinoasă.

Supraviețuirea la un an nu a putut fi calculată datorită lotului mic de studiu și a lipsei semnificației statistice a rezultatelor obținute, dar menționăm că dintre pacienții decedați, patru au avut stadiul IV, doi stadiul III, și unul stadiul II.

În acest studiu singurul efect atribuit cardiotoxicității a fost reprezentat de o tulburare de ritm prezentă la un singur pacient care a necesitat implantarea unui cardiostimulator permanent de tip „*pacemaker*”. Această manifestare a cardiotoxicității a fost observată după trei cicluri de tratament pe bază de fluorouracil, iar chimioterapia a fost întreruptă. Nu s-au observat alte efecte adverse legate de tratamentul chimioterapic la restul pacienților care au fost urmăriti pe toată durata studiului.

<b>Tabelul 3. Evaluarea prin ecografie cardiacă pre și un an post-chimioterapie</b>				
	<b>FE%</b>	<b>SR(%)</b>	<b>SL(%)</b>	<b>SC(%)</b>
<b>Baseline</b>	61.8±5.7	62.5±4.5	22.1±1.9	21.3±1.4
<b>Final</b>	59.1± 6.1	61.2±3.5	20.05±3	20.4±1.7
<b>P</b>	0.1592	0.3263	0.0176	0.0777

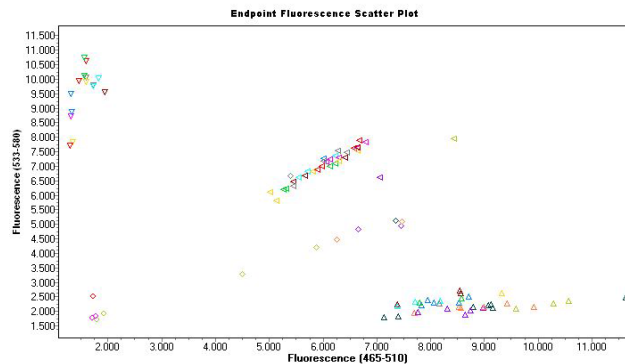
Intervalul de încredere în toate situațiile este nesemnificativ statistic datorită numărului redus de pacienți care au putut fi urmăriți, precum și a faptului că doar un pacient a prezentat o afectare cardiacă post chimioterapie.

ADN-ul extras (extracție manuală și automată) a fost cuantificat prin două metode. Avantajul comparării rezultatelor acestor metode a constat în stabilirea similitudinii rezultatelor cantitative și calitative, astfel am putut renunța la metoda fluorimetrică care are un cost mai ridicat datorită consumabilelor utilizate.

Genotiparea utilizând metoda real time PCR cu sonde moleculare de tip KASP a avut beneficiul că nu a necesitat normalizarea cantității de ADN (aceeași cantitate de ADN exprimată în micrograme se calculează pentru fiecare probă dar volumele finale sunt diferite și necesită o completare cu apă purificată special pentru PCR). Calculele adiacente fiecărei reacții

precum și protocolul oferit de producător a simplificat această metodă de genotipare, ducând la scăderea costurilor și a timpului necesar analizei. Fluorescența emisă și captată de sistemul Light Cycler 480 (Roche USA), a fost peste valoarea prag pentru unele probe, unele rezultate fiind marcate ca necunoscut pentru 15 pacienți din lotul martor dar acest lucru a putut fi corectat prin interpretarea manuală a valorilor fluorescenței emise (figura 1).

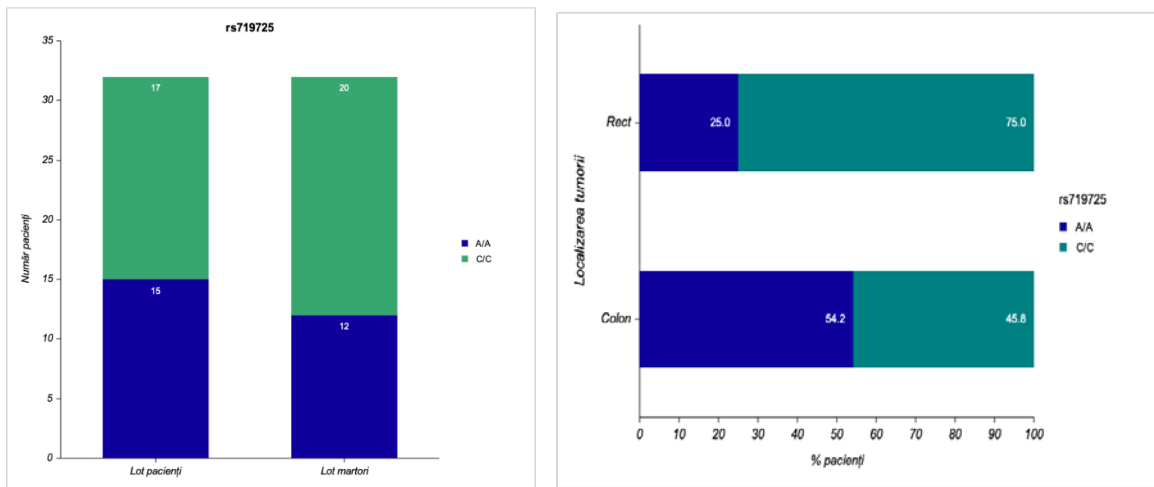
**Figura 1. Analiza Endpoint Genotyping rs9344 pentru ambele loturi și probele din lotul control rs2273535 pentru sonda corespunzătoare alelei X a polimorfismului.** Se poate observa controlul negativ în marginea inferioară stângă a figurii.



### rs719725

Primul polimorfism analizat a fost reprezentat de rs719725, situat într-o regiune intergenică pe cromozomul 9p24.1, la 37 kb de regiunea responsabilă de sinteza unei proteine tumorale D52-like (TPD52L3) (20, 21). Alela ancestrală include nucleotidul C în poziția relevantă, iar secvența variantă este A. Genotipurile posibile sunt, prin urmare, homozigot ancestral (C/C) și homo- sau heterozigot ce conține varianta alelică (A/A și A/C). Studiul nostru a descoperit pentru varianta A/A un OR= 1.47, 95% CI 0.5425 la 3.9861 z=0.758, asemănătoare datelor raportate în literatură dar din punct de vedere al semnificației statistice (p=0.448), este necesară analiza pe un lot populațional mult mai mare. Am observat o prezență mai mare a alelei A în cadrul lotului de studiu (46%) comparativ cu lotul martor (37%). De asemenea distribuția pe sexe a fost asemănătoare cu cea descrisă în alte studii. Datele noastre pentru acest polimorfism sunt asemănătoare cu cele raportate de Zanke et al și Poynter et al în privința riscului, OR= 1.49, dar datorită unui p mai mare de 0.05 nu putem afirma o semnificație statistică a acestui polimorfism (22, 23) în lotul studiat. Nu am identificat nici un profil heterozigot (A/C) în ciuda faptului că raportarea în literatură este de 0,3 (24). Au fost mai mulți pacienți care au avut tumori localizate la nivelul colonului și au prezentat varianta A/A (13 pacienți cu tumori de colon) decât la nivelul rectului (doi pacienți cu tumori de rect) (figurile 2 și 3).

**Figurile 2 și 3. Distribuția profilelor genetice pentru polimorfismul rs719725**

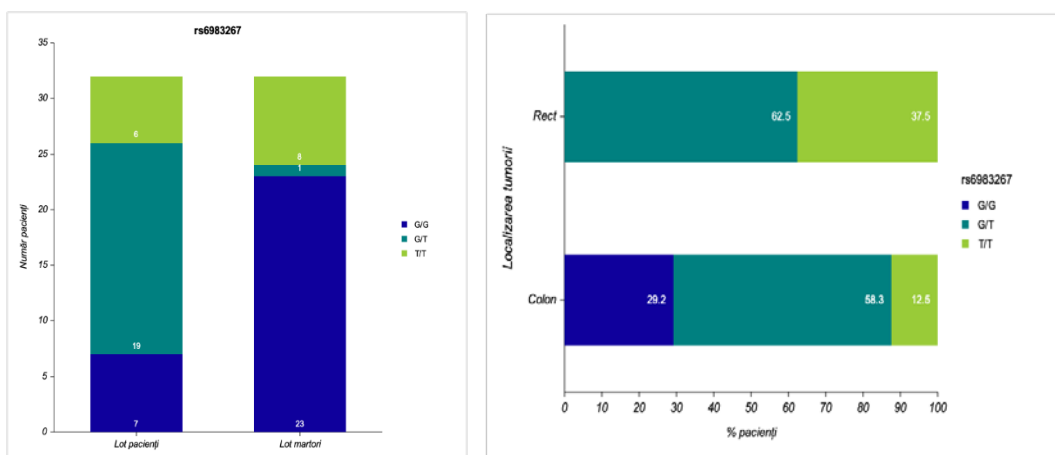


**rs6983267**

Al doilea polimorfism a fost reprezentat de rs6983267. Acesta este situat la nivelul cromozomului 8q24.21, între regiunea 128.47-128.54 MB în amonte de gena MYC (o oncogenă cunoscută) denumită regiunea 3, responsabilă de genele CASC8 și CCAT2 (25). Acesta prezintă alela ancestrală T și varianta G.

Cercetarea asupra acestui polimorfism aparent cotroversat pentru gradul său predictiv în patologia colorectală a arătat un OR=0,1096, 95% CI 0,035 - 0.342, p=0,0001 pentru varianta G/G vs T/T și OR=45,30 cu CI= 5,47 - 374.69, p=0,0004 pentru G/T vs T/T.

**Figurile 4 și 5. Distribuția profilelor genetice pentru polimorfismul rs6983267**



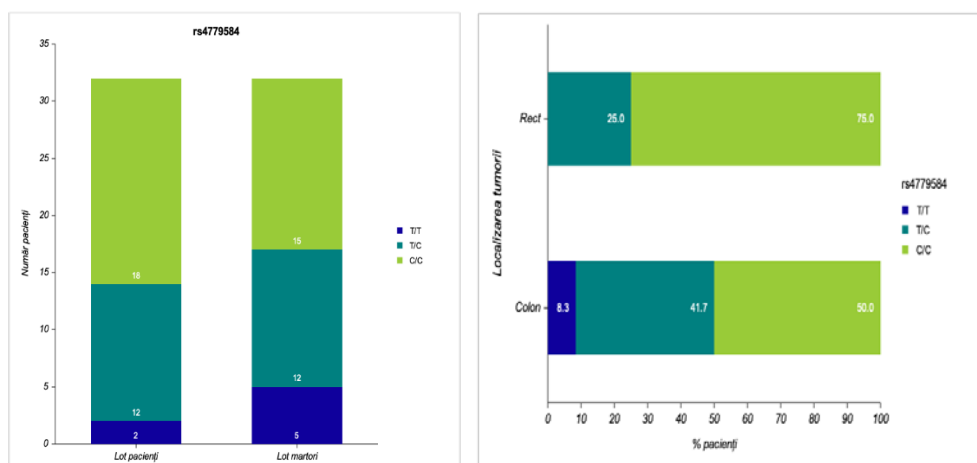
Un număr mai mare de pacienți cu cancer colorectal au prezentat cel puțin o alelă G (81,2%) comparativ cu lotul martor (76,57%) chiar dacă frecvența alelei G a fost mai mare în lotul martor datorită unui număr mai mare de profile homozigote G/G (figurile 4 și 5).

Riscul de a dezvolta cancer colorectal pentru varianta G/T în acest studiu este diferit din punct de vedere statistic cu cele raportate în literatură. Putem nota că OR pentru indivizii heterozigoți care au alela de risc crescut (G/T) a fost mai mare decât pentru indivizii homozigoți (G/G), dar varianta homozigotă G/G a fost identificată doar la pacienții care au prezentat tumori localizate la nivelul colonului (n=7) fără să fie identificată la pacienți cu tumori rectale. Valoarea crescută a OR este datorată faptului că în lotul control am identificat un singur pacient cu varianta heterozigotă G/T. În pofida unei populații relativ mici analizate, am obținut  $p < 0.05$  prin urmare putem afirma că prezența variantelor polimorfismului rs6983267 (G/G, G/T) este asociată cu patologia neoplazică colorectală în lotul nostru de studiu – respectiv o populație română omogenă.

#### rs4779584

Polimorfismul rs4779584 se găsește proximal de locusul genei GREM1 pe cromozomul 15q13.3. Această genă codifică un membru al familiei antagoniste de proteine morfogenice osoase (BMP), componentă esențială în cascada de activare a factorului de transformare- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), iar calea TGF- $\beta$ /BMP a fost demonstrată că are un rol important în carcinogeneza neoplasmelor colorectale (26, 27).

**Figurile 6 și 7. Distribuția profilelor genetice pentru polimorfismul rs4779584**



Datele obținute de noi arată o prezență mai mare a alelei de risc T în cadrul lotului martor decât în lotul de studiu (53.13% vs 43.75%), iar pentru prezența profilului homozigot cu risc crescut T/T am obținut OR=0.3600 95% CI 0.064 la 2.011,  $p=0.244$ , fără semnificație

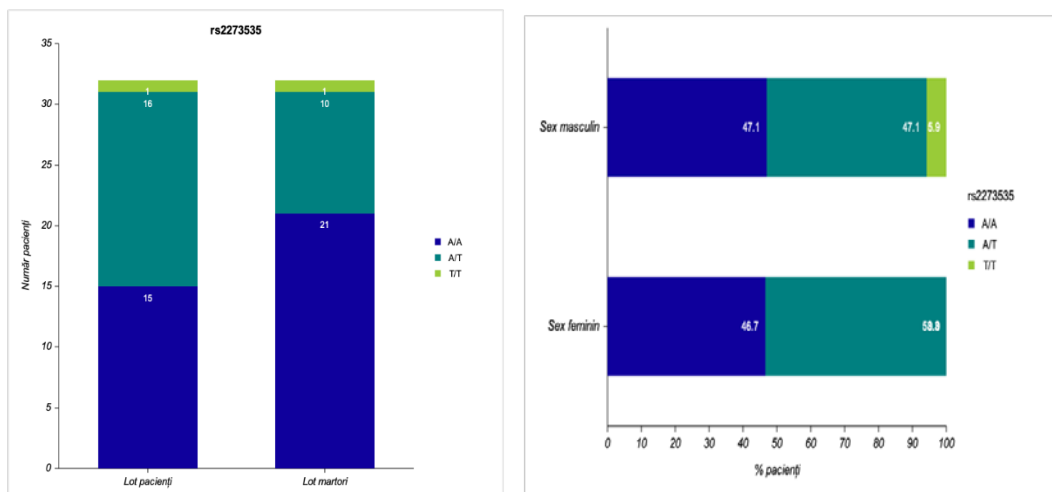
statistică. Aceste rezultate sugerează o situație similară celei citate anterior (285), în care e inversată alela majoră cu cea minoră a rs4779584. De asemenea, această variantă a fost identificată doar la pacienții de sex masculin din lotul de studiu iar aceștia au prezentat neoplasm de colon (11.76%). Situația variantei de risc heterozigote T/C nu a putut fi analizată deoarece a fost prezentă în cantități egale în ambele loturi cu mențiunea că pacienții din lotul de studiu cu acest profil heterozigot au prezentat mai mult tumori de colon decât de rect (41.7% vs 25%) (figurile 6 și 7). Un număr tot mai mare de studii sugerează că prezența variantelor polimorfismul rs4779584 cresc susceptibilitatea cancerului colorectal însă rezultatele noastre nu pot confirma acest lucru datorită raportului asemănător între loturi precum și dimensiunii lotului.

### rs2273535

Polimorfismul rs2273535 se găsește situat pe cromozomul 20 în poziția 56386485, intrând în componența genei AURKA; prezintă profilul ancestral (major) de tip A, iar alela variantă fiind reprezentată de T, în genotipurile homozigote și heterozigote, T/T și A/T.

În studiul nostru, un număr mai mare de pacienți cu cancer colorectal au prezentat cel puțin o alele T (53.12%) comparativ cu lotul martor (34.37%) chiar dacă frecvența alelei T a fost mai mare în lotul martor datorită unui număr mai mare de profile homozigote T/T. Datorită identificării variantei homozigote T/T în aceeași cantitate în ambele loturi, nu am putut stabili impactul acesteia asupra riscului cancerului colorectal (figurile 8 și 9). Pentru varianta heterozigotă A/T am putut calcula OR=2.20 95% CI 0.793 la 6.096, p=0.129, care, deși prezintă o asociere cu cancerul colorectal și un risc mai mare decât cel raportat în literatură, nu atinge pragul de semnificație statistică în studiul de față.

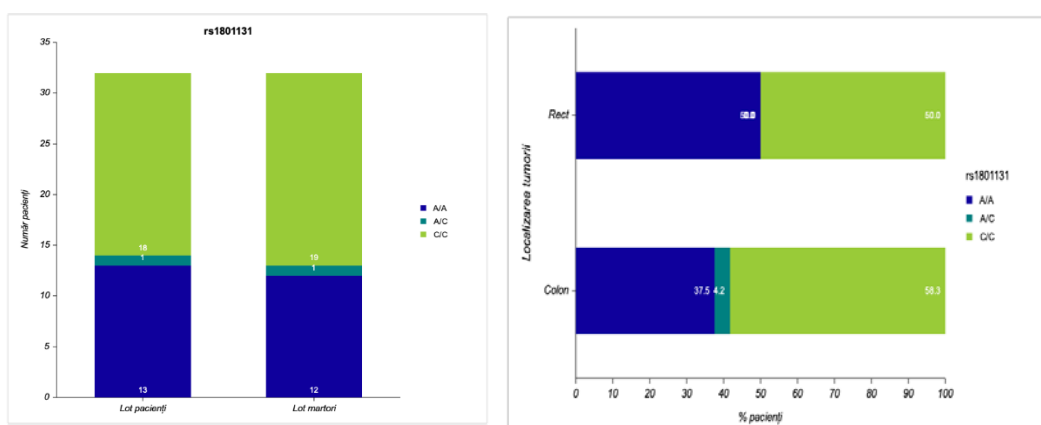
**Figurile 8 și 9. Distribuția profilelor genetice pentru rs2273535**



## rs1801131

Acest polimorfism cunoscut și sub denumirea de A1298C sau E429A, reprezintă o mutație la nivelul genei MTHFR unde alela ancestrală A este înlocuită de varianta C generând două profile de risc adițional, unul homozigot C/C și altul heterozigot A/C, realizând o substituție a glutaminei429 la alanină. Gena MTHFR este direct implicată în metabolismul 5-fu, iar alterări ale funcției acesteia pot duce la acumulări de chimioterapic, crescându-i toxicitatea (28).

**Figurile 9 și 10 Distribuția profilelor genetice pentru rs1801131**



În urma analizei distribuției alelelor în ambele loturi (figurile 9 și 10) am observat că în ciuda unui pacient care a prezentat o copie a alelei C, distribuția în ambele loturi a fost egală pentru fiecare profil, precum și distribuția între sexe existând un singur pacient de sex masculin în lotul de studiu care să prezinte varianta cu risc. Nu am putut efectua o analiză completă datorită acestor date și datorită limitărilor acestui studiu în ceea ce privește numărul de pacienți incluși. Am obținut pentru varianta C/C un OR=1.136 CI 0.421-3.067 și p=0.8. Chiar dacă nu avem semnificație statistică, OR este apropiat de cel descris în literatura de specialitate

## rs9344

Ultimul polimorfism analizat a fost reprezentat de către rs9344, situat pe cromozomul 11 în poziția 69648142; locusul intră în constituția genei CCND1 (ciclina D1), alela ancestrală fiind A cu varianta T în profilul homozigot T/T și heterozigot A/T. Datele referitoare la CCND1 și utilitatea sa ca biomarker în cancerul colorectal sunt limitate, dar o supraexpresie a proteinei date de această genă a fost asociată cu o scădere a supraviețuirii globale a pacienților diagnosticați cu neoplasm colorectal (29).

În studiul nostru datorită prezenței asemănătoare a profilelor analizate în ambele loturi studiate precum și a semnificației statistice inexistente determinate de lipsa unor loturi

populaționale mari, nu s-a putut elabora decât o statistică descriptivă ( figura 1). Am obținut OR=1.133 cu CI 0.424-3.022 și p=0.802 pentru varianta G/A și OR=1.19 CI=0.373-3.792 cu p=0.768 pentru varianta A/A.

### **Limitele studiului**

Limitările acestui studiu au fost reprezentate de:

- Populația de studiu a fost foarte mică comparativ cu ce am întâlnit în literatura de specialitate deoarece au existat criteriile de includere/excludere stricte care au dus la excluderea unui număr mare de pacienți potențial candidați.
- Urmărirea pe parcursul studiului a fost destul de dificilă și s-au pierdut pacienți înrolați (au fost pacienți care nu au venit la vizitele de control sau care au decedat înainte de controlul stabilit).
- Lotul de studiu mic nu a surprins în totalitate distribuția raportată pentru polimorfismele analizate.
- Costurile mari asociate acestei metode de genotipare au permis analiza unui număr limitat de pacienți pentru polimorfismele căutate
- Componenta longitudinală mică (urmărirea la un an post chimioterapie față de urmărirea la cinci ani), pentru aprecierea supraviețuirii.

Originalitatea acestei cercetări constă în faptul că reprezintă primul studiu de acest fel care să analizeze simultan prezența a patru polimorfisme cu risc în patologia cancerului colorectal și două implicate în metabolizarea chimioterapicelor specifice tratamentului oncologic pentru această patologie, la o populație omogenă reprezentată de cetățeni români, realizat într-un centru universitar din România. De asemenea, pentru analiza și urmărirea ecocardiografică a fost necesară excluderea pacienților care au prezentat patologii cardiace preexistente, iar protocolul aplicat a utilizat parametrii noi de identificare a disfuncției cardiace subclinice. Rezultatele obținute sunt primele de acest fel pentru o populație omogenă est-europeană, respectiv română.

Rezultatele obținute conferă importanță acestui studiu deoarece acesta întărește ipoteza asocierii unor anumite profile genetice cu risc și patologia malignă colorectală.



## 4. Concluzii

Studiul de față a urmărit identificarea prezenței unor profiluri genetice asociate cu risc crescut de a dezvolta CCR, și descrierea asocierii între acestea și alte variabile clinico-patologice a șase polimorfisme uninucleotidice la o populație de 64 de pacienți divizați în două loturi, lotul caz fiind reprezentat de 32 de pacienți diagnosticați cu neoplasm colorectal în diferite stadii evolutive, care au urmat post-operator tratament chimioterapic specific, și un lot martor reprezentat de 32 de persoane fără cancer colorectal. Principalele concluzii ale studiului sunt:

- Acesta este primul studiu din România care a evaluat asocierea între prezența unor anumite polimorfisme uninucleotidice și patologia neoplazică colorectală, precum și identificarea disfuncției cardiace subclinice indusă de chimioterapie.
- S-a reușit constituirea unui lot de studiu omogen, ce respectă criteriile stricte de includere. Ținând cont de obiectivele urmărite, lotul este unul compatibil ca dimensiuni și omogenitate cu loturile de studiu utilizate în studiile prezentate în literatura de specialitate curentă.
- Studiul a reușit punerea la punct și optimizarea unei metode robuste, bazate pe real-time PCR, pentru determinarea genotipului subiecților studiați. Au fost analizate șase polimorfisme uninucleotidice.
- Studiul a evidențiat o asociere între prezența unui profil genetic reprezentat de polimorfismele **rs6983267**, **rs4779584**, **rs2273535**, **rs719725**, **rs1801131**, **rs9344** și prezența neoplasmului colorectal.
- Frecvențele alelelor ancestrale, respectiv variante (minore), în populația de studiu au fost în general similare cu cele raportate în baze de date internaționale (HapMap) pentru populația caucaziană cu origine în Europa de Vest.
- S-a remarcat corelarea prezenței cancerului colorectal cu frecvența crescută a genotipurilor heterozigote și homozigote conținând alele variante pentru rs6983267. Pentru rs719725, chiar dacă am observat o corelație, aceasta nu are semnificație statistică.
- Nu s-a putut stabili o corelație între prezența cancerului colorectal și prezența polimorfismelor *rs4779584*, *rs2273535*

- Studiul efectuat sprijină datele existente în literatură ce arată o incidență scăzută a cardiotoxicității induse de chimioterapicele utilizate în tratamentul cancerului colorectal.
- Doar trei pacienți au prezentat grade variate de afectare a funcției cardiace în urma chimioterapiei, dintre aceștia unul prezentând efecte adverse majore. S-a remarcat o scădere ușoară, dar semnificativă statistic, post-terapie a fracției de ejeție, a strainului radiar și longitudinal și a ariei de strain.
- Nu s-a putut stabili o corelație între tratamentul chimioterapic adjuvant, și genotipurile rs1801131, rs9344.
- Factorii agregați care se asociază evoluției bolii au fost în general asemănători cu cei descriși în literatură.
- Nivelul seric al CEA și CA19-9 s-a corelat cu durata de la debutul simptomatologiei până la diagnostic, valori crescute fiind observate la o simptomatologie de durată.
- Nivelele serice crescute de CA19-9 s-au corelat cu numărul de ganglioni limfatici invadați.
- Studiul nostru a demonstrat că există o asociere semnificativă între prezența sindromului inflamator și neoplasmul colorectal în conformitate cu datele din literatura de specialitate.
- Durata spitalizării unui pacient diagnosticat cu neoplasm colorectal este mult crescută în comparație cu cea din alte centre medicale europene.
- Durata spitalizării a fost influențată de factori precum durata simptomatologiei, stadializarea tumorală, durata și tipul intervenției chirurgicale precum și infecția post-operatorie cu *Clostridium difficile*.
- Există o asociere semnificativ statistic între intervalul de la debutul simptomatologiei la momentul diagnosticului și supraviețuirea la un an.
- Nu s-a constatat o asociere semnificativ statistic între prezența sindromului anemic și patologia colorectală.
- Între durata intervenției chirurgicale și supraviețuirea la un an nu s-a găsit o asociere semnificativă statistic, intervențiile care au avut un timp mai scurt au avut cele mai multe decese.
- Sunt necesare studii ulterioare, pe loturi extinse, precum și analiza cost/beneficiu pentru a recomanda introducerea genotipării unor SNP în populația cu risc crescut

de cancer colorectal în vederea personalizării terapiei de screening și diagnostic prin metode convenționale.

## Bibliografie

1. Kuipers EJ, Rosch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. *Nature reviews Clinical oncology*. 2013;10(3):130-42.
2. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15065.
3. Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(24):2231-47.
4. 2016 NCINDoCTAahwcpdc-tAF.
5. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2014;15(10):1063-93.
6. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, Androulakis N, Athanasiadis A, Boukovinas I, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Annals of gastroenterology*. 2016;29(1):18-23.
7. Saif MW, Quinn MG, Thomas RR, Ernst A, Grem JL. Cardiac toxicity associated with capecitabine therapy. *Acta oncologica*. 2003;42(4):342-4.
8. Gaveau T, Banzet P, Marneffe H, Viars P. [Cardiovascular disorders in the course of antimetabolic infusions at high doses. 30 clinical cases]. *Anesthesie, analgesie, reanimation*. 1969;26(3):311-27.
9. Ng M, Cunningham D, Norman AR. The frequency and pattern of cardiotoxicity observed with capecitabine used in conjunction with oxaliplatin in patients treated for advanced colorectal cancer (CRC). *European journal of cancer*. 2005;41(11):1542-6.
10. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
11. Middleton FA, Pato MT, Gentile KL, Morley CP, Zhao X, Eisener AF, et al. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. *American journal of human genetics*. 2004;74(5):886-97.
12. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral medicine*. 2016;32(3):158-64.
13. Saito G, Sadahiro S, Okada K, Tanaka A, Suzuki T, Kamijo A. Relation between Carcinoembryonic Antigen Levels in Colon Cancer Tissue and Serum Carcinoembryonic Antigen Levels at Initial Surgery and Recurrence. *Oncology*. 2016;91(2):85-9.
14. Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Scientific reports*. 2018;8(1):2732.
15. Eiro N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World journal of gastrointestinal surgery*. 2012;4(3):62-72.
16. Dunne JR, Gannon CJ, Osborn TM, Taylor MD, Malone DL, Napolitano LM. Preoperative anemia in colon cancer: assessment of risk factors. *The American surgeon*. 2002;68(6):582-7.
17. Stapley S, Peters TJ, Sharp D, Hamilton W. The mortality of colorectal cancer in relation to the initial symptom at presentation to primary care and to the duration of symptoms: a cohort study using medical records. *British journal of cancer*. 2006;95(10):1321-5.
18. Aravani A, Samy EF, Thomas JD, Quirke P, Morris EJ, Finan PJ. A retrospective observational study of length of stay in hospital after colorectal cancer surgery in England (1998-2010). *Medicine*. 2016;95(47):e5064.
19. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):153-73.

20. Cao Q, Chen J, Zhu L, Liu Y, Zhou Z, Sha J, et al. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;344(3):798-806.
21. International HapMap C. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
22. Poynter JN, Figueiredo JC, Conti DV, Kennedy K, Gallinger S, Siegmund KD, et al. Variants on 9p24 and 8q24 are associated with risk of colorectal cancer: results from the Colon Cancer Family Registry. *Cancer research*. 2007;67(23):11128-32.
23. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nature genetics*. 2007;39(8):989-94.
24. He J, Wilkens LR, Stram DO, Kolonel LN, Henderson BE, Wu AH, et al. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(1):70-81.
25. Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, et al. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. *Nature genetics*. 2007;39(5):638-44.
26. Xiong F, Wu C, Bi X, Yu D, Huang L, Xu J, et al. Risk of genome-wide association study-identified genetic variants for colorectal cancer in a Chinese population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(7):1855-61.
27. Karagiannis GS, Musrap N, Saraon P, Treacy A, Schaeffer DF, Kirsch R, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biological chemistry*. 2015;396(2):163-83.
28. Etienne-Grimaldi MC, Francoual M, Formento JL, Milano G. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and fluorouracil-based treatments in colorectal cancer. *Pharmacogenomics*. 2007;8(11):1561-6.
29. Maeda K, Chung Y, Kang S, Ogawa M, Onoda N, Nishiguchi Y, et al. Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Oncology*. 1998;55(2):145-51.