

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”,
BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DOMENIUL MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

ROLUL ANGIOGENEZEI ÎN DEZVOLTAREA MELANOMULUI MALIGN

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. ANGHEL RODICA-MARICELA

Doctorand:

CHIPER (CĂS.BUDIRINCĂ) MARIA ALEXANDRA

Introducere

Cancerle de piele reprezintă 15-20% din totalul cancerelor, iar melanomul malign reprezintă 3-4% dintre acestea și produce decese în procent de 70% din totalul cancerelor cutanate. Melanomul malign reprezintă 2% din totalul cancerelor. Incidența variază între 0.1 la 10.000 de locuitori în regiunile nordice ale planetei până la 17 la 10.000 de locuitori în Australia. (1,2) Atât în România, cât și la nivel mondial, melanomul reprezintă a XIX-a cea mai frecventă neoplazie. Incidența a crescut atât de mult față de începutul secolului XX încât în momentul de față se estimează că 1 din 73 de femei și 1 din 39 de bărbați dezvoltă această afecțiune. Se pare că după cancerul mamar tinde să devină a doua neoplazie la femei și a treia la bărbați după cancerul pulmonar și cel de prostată. Dacă în ultimii zece ani mortalitatea prin cancer la bărbați a scăzut cu 18%, mortalitatea prin melanom a scăzut doar cu 2% iar în rândul femeilor dacă mortalitatea prin cancer a scăzut cu 12%, cea prin melanom malign a scăzut doar cu 3%. Mortalitatea prin melanom malign a fost întotdeauna extrem de importantă datorită agresivității acestui tip de tumoră, capacității crescute de invazie locală și metastazare și, datorită înaltei rezistențe la tratamentele clasice-imunoterapie, chimioterapie, radioterapie, în ciuda noilor terapii (imunoterapia cu Ipilimumab și terapia moleculară țintită cu Vemurafenib). Și în România mortalitatea se menține crescută, dar prin introducerea în protocoalele terapeutice a noilor tratamente se speră la o reducere a acesteia în următorii ani. (3,4)

Primul pas în definirea și stabilirea diagnosticului melanomului malign cutanat este obținerea unui rezultat clar histopatologic. Acesta se realizează în urma recoltării prin biopsie a unui fragment de țesut, care va fi prelucrat în laboratorul de anatomie-patologică astfel încât să se împiedice alterarea structurii morfologice, funcționale compatibilă cu cea din țesutul viu. După fixarea țesutului și spălarea acestuia, se efectuează includerea în parafină, secționarea blocului, colorarea și identificarea elementelor specifice în vederea elaborării diagnosticului. (5)

În cazul unui rezultat pozitiv, raportul anatomopatologic conține date legate de indicele Breslow, prezența sau absența ulcerăției, rata mitotică, prezența sau absența invaziei tumorale la nivelul marginilor exciziei, prezența sau absența micrometastazelor satelite și nivelul Clark. Când privește diagnosticul diferențial, clinicianul va trebui să aibă în vedere posibilitatea diferențierii melanomului cu dezvoltare superficială de nevii dobândiți, keratozele seboreice pigmentate, carcinoamele bazocelulare pigmentate, să diferențieze

melanomul nodular de hemangiom, nevil spitz de dermatofibrom, să diferențieze melanomul subunghial de hematom. În acest scop ajutorul clinicianului este dat de testele de imunohistochimie care permit ca din piesele de biopsie să se identifice o serie de markeri cu rol diagnostic și predictivi.

Prima etapă în tratamentul curativ al melanomului malign localizat este intervenția chirurgicală, rezecția locală cu margini largi, împreună cu disecția ganglionului santinelă și/sau disecție ganglionară electivă, în caz de ganglioni loco-regionali suspecti clinic sau ganglion santinelă pozitiv. Chirurgia este adesea folosită și în cazul metastazelor. Radioterapia are rol limitat în tratamentul melanomului malign. (7) Chimioterapia, în acest caz, este destul de restrictivă, citostaticele frecvent utilizate fiind dacarbazina, cisplatinul, paclitaxelul, vincristinul, bleomicina, temozolomida, fie imunoterapie cu IL2 high dose sau ipilimumab, fie terapie țintită cu inhibitori tirozinkinazici, ca vemurafenibul. Această terapie se poate aplica dacă starea pacientului permite, dacă este echilibrat biologic și nu prezintă comorbidități. Pacienții pot să mai fie incluși în trialuri clinice care presupun o serie de criterii de admisie și, în ultimul rând, se poate apela la terapia paliativă. Date fiind opțiunile reduse de tratament în melanomul malign, devine imperios necesar a se identifica noi ținte moleculare care să permită îmbunătățirea abordării terapeutice. Pentru aceasta însă este necesară o mai bună cunoaștere a mecanismelor de transformare celulară, de creștere tumorală, de metastazare la distanță. (8-10).

Obiective specifice

Teza de doctorat cu titlul “Rolul angiogenezei în dezvoltarea melanomului malign”, realizată sub îndrumarea Doamnei Profesor Dr. Rodica Anghel își propune caracterizarea procesului de angiogeneză, urmărindu-se în mod special modificările de semnalizare date de speciile reactive de oxigen, rolul acestora în creșterea și dezvoltarea tumorilor, precum și identificarea prin mijloace noi, optice, neinvazive a modificărilor tisulare. Lucrarea este o cercetare fundamental-aplicativă, executată pe modele experimentale in vivo și in vitro.

Teza este redactată conform cerințelor școlii doctorale și este structurată în două părți principale.

Prima parte, reprezentată de partea generală, cuprinde studii teoretice și noțiuni legate de incidență, tipul, caracteristicile și tratamentul melanomului malign, accentul fiind pus pe procesul de angiogeneză, fazele acestuia, factorii implicați în dezvoltarea neovascularizației, precum și rolul hipoxiei și a speciilor reactive de oxigen în acest context.

A doua parte sau partea specială cuprinde cercetările personale, originale, distribuite în mai multe capitole.

Capitolul patru reprezintă un studiu retrospectiv al pacienților internați în perioada 2010-2018 în Institutul Oncologic București. Cercetările întreprinse au avut la bază studiul datelor clinice a 68 foi de observație din care s-au obținut date statistice relevante pentru diagnostic și utilizabile în monitorizarea eficienței tratamentului. Tot în acest capitol sunt introduse date obținute experimental care susțin procesul de reprogramare metabolică regăsit și în transformarea malignă asociată melanomului cutanat. Rezultatele vin să completeze tabloul clinic și metabolic al pacienților cu melanom malign cutanat, tablou utilizabil în elaborarea viitoare a unor protocoale de diagnostic și monitorizare în cazul acestei maladii.

Următorul capitol dezvăluie crearea unui model experimental *in vivo*, un model murin, reproductibil, ușor de întreținut care poate fi caracterizat și urmărit în dinamica creșterii și dezvoltării tumorii studiate. În acest scop s-a caracterizat un melanom murin B16 grefat pe șoareci *in-breed* C57Bl/6. S-a urmărit creșterea tumorală monitorizându-se volumul tumoral și modul de transplantare care să nu afecteze proprietățile tumorii prin pasaje seriate. Utilizarea animalelor pentru experimentarea în laborator în vederea descrierii și înțelegerii unei funcții biologice generale a fost invariabil susținută de ideea că există o mare unitate mai întâi a mecanismelor fiziologice, apoi a mecanismelor moleculare. Desigur, o mulțime de informații esențiale pentru cercetarea medicală și biologie sunt deduse din studiul animalelor. Ceea ce, evident, determină necesitatea sistemelor experimentale în știință.

Capitolul șase din această parte a tezei a urmărit caracterizarea biochimică a tumorilor experimentale induse, monitorizându-se prin tehnici biochimice spectrofotometrice reacțiile de degradare oxidativă a lipidelor, proteinelor și producerea antioxidanților totali, atât în contextul creșterii și dezvoltării tumorale, dar și în modificările date de tratament anti-angiogenic. Determinările au fost efectuate din serul animalelor purtătoare de tumori, dar și din țesutul tumoral comparativ cu țesutul hepatic. Datele biochimice obținute sugerează că Bevacizumab inhibă producerea speciilor reactive de oxigen în prima etapă de tratament în condiții de hipoxie într-o manieră dependentă de doză, ca apoi să se modifice profilul reacțiilor oxidative dirijate spre apoptoză.

Capitolul șapte cuprinde un studiu *in vitro* efectuat pe celule de melanom murin obținut din tumorile caracterizate anterior și urmărește prin tehnici de citometrie în flux producerea în timp real a speciilor reactive de oxigen. Datele obținute ne îndreptățesc să afirmăm că speciile reactive ale oxigenului au un rol dual și anume: în concentrații mici, corespunzătoare primelor concentrații de Bevacizumab testat, au un rol semnalizator al

hipoxiei, declanșează reacții care se asociază cu un profil angiogenic al celulelor, dar care nu pot fi stopate. Drept urmare, mecanismele biochimice vor fi redirecționate spre producerea de specii reactive în exces care participă la dezvoltarea citotoxicității apoptotice. Administrarea Bevacizumabului în cultura de celule are un efect direct asupra celulelor tumorale prin inducerea apoptozei timpurii și târzii.

Capitolul opt este unul inovator, interdisciplinar care a încercat caracterizarea optică a țesutului malign în vederea obținerii unor tehnici de diagnostic eficiente, neinvazive, ușor de realizat. S-a introdus astfel tomografia optică coerentă, combinată cu tehnici de polarizare care să identifice precoce modificările survenite transformării maligne a țesuturilor sub forma analizei complexe a structurilor optico-geometrice, a arhitecturii acestora pe diferite nivele ale ierarhiei – fractali și multifractali.

Rezultatele de etapă obținute, care încă necesită studii ulterioare și îmbunătățiri ale tehnicilor abordate sunt capabile să înregistreze microstructuri până la o rezoluție celulară pe o mare suprafață a țesuturilor. Contrastul de reflectare (întoarcere înapoi) este furnizat de diferențele de indice de refracție între aceste microstructuri. Întrucât, spre deosebire de metodele histologice în care contrastele de imagine au fost pe deplin înțelese și corelate cu evenimentele fiziologice din țesuturi, interpretarea imaginii cu reflectare optică se bazează pe asemănări morfologice sau arhitecturale histologice, lăsând bazele biologice care stau la baza contrastului puțin corelate.

Pentru translatarea cu succes a utilizării datelor în practica clinică, prelucrarea și analiza rezultatelor trebuie realizate în perioade de timp acceptabile din punct de vedere clinic, al urgenței medicale și a stării pacientului.

Nu există linii directe de consens privind utilizarea tomografiei de coerență optică (OCT) pentru diagnosticul melanomului cutanat. Utilizarea OCT în diagnosticul melanomului este rar raportată în literatură. Este necesară creșterea și standardizarea raportării OCT pentru diagnosticul melanomului cutanat. Considerăm astfel că aceste rezultate reprezintă un pionierat în studiile optice ale melanomului malign, cu posibilități imense de dezvoltare.

Cu toate mecanismele identificate, angiogeneza ridică încă o serie de întrebări, este asociată cu multe etape din procesul ei complex, încă neelucidate pe deplin la nivel molecular, celular. Angiogeneza este un proces bine coordonat, balansat de factori pro- și antiangiogenici. Când balanța este distrusă rezultă angiogeneza patologică care cauzează creșterea formării vaselor de sânge în boli care depind de angiogeneză. Eforturile actuale ale oamenilor de știință, în domeniul melanomului malign, urmăresc identificarea unor markeri

moleculari cât mai sensibili și mai specifici, care să permită evaluarea riscului de dezvoltare a melanoamelor, stabilirea unui diagnostic și prognostic de mare certitudine, precum și utilizarea unor terapii selective (țintite), care să aducă beneficii maxime pacientului.

Progresul tehnicilor imagistice în domeniul acestei patologii atrage după sine necesitatea de a stabili markeri adiționali cu caracter prognostic și predictiv pentru o gestionare mai eficientă a leziunii primare, capacitatea de a realiza o discriminare cantitativă între angiogeneză și vasele pre-existente în tumori pare a fi un factor determinant în evaluarea angiogenezei tumorale.

Dacă prin rezultatele obținute am reușit să îmbunătățim cunoștințele legate de complicatul proces al angiogenezei, am reușit să furnizăm informații deosebit de utile specialiștilor din domeniul oncologiei, cercetătorilor, farmaciștilor, medicilor tineri rezidenți și, nu în ultimul rând, pacienților, considerăm că am atins scopul propus inițial și anume cel de a elabora o lucrare fluentă, logică, documentată și experimentată care să încerce să elucideze mecanismele asociate angiogenezei și, prin aceasta să fim de un real folos în îmbunătățirea diagnosticului, prognosticului, tratamentului și evoluției melanomului malign.

Metodologia generală a cercetării

IV. Studiu retrospectiv al melanomului malign cutanat

Studiul retrospectiv a inclus 68 pacienți, diagnosticați în intervalul 2010-2018, la Institutul Oncologic București. Datele au fost colectate din foile de observație, respectându-se reglementările în vigoare referitoare la protecția datelor. Nu au fost folosite niciun fel de date personale. Valorile înregistrate au fost utilizate numai în calcule statistice. Comisia de etică a institutului a fost informată în legătură cu utilizarea acestor date.

Tratamentul pacienților cu melanom malign trebuie să fie decis în cadrul unei echipe multidisciplinare. Drept urmare, în cadrul institutului, pentru cazurile care ridică probleme există sesiuni de „tumor board” în care se discută toate cazurile care pot ridica întrebări multidisciplinare.

Abordarea terapeutică inițială în melanom este intervenția chirurgicală, care s-a aplicat întregului lot de pacienți, urmată de excizie ganglion santinelă sau evidare ganglionara regională. Marea majoritate a pacienților au fost tratați conform deciziei comisiei multidisciplinare. Pacienților li s-a practicat actul chirurgical mai sus menționat. Scopul intervenției chirurgicale a fost rezecția totală a leziunii, în limite de siguranță oncologică, și, de asemenea, o stadializare cât mai corectă. În funcție de grosimea tumorii, marginile

recomandate variază între 0,5-1 cm pentru tumora in situ, 1-2 cm pentru grosime de 1-2 mm și margini mai mari de 2 cm pentru o grosime a tumorii mai mare de 2 mm.

Intervenția chirurgicală a constat în excizia largă a leziunii, cu limite de siguranță oncologică. La 36 pacienți (52,94%) s-a biopsiat ganglionul santinelă, iar la 12 pacienți (17,64%) s-a efectuat limfadenectomie regională.

Chimioteropia a fost administrată conform protocoalelor aplicate în institut. La anumiți pacienți s-a intervenit și cu tratamente adjuvante, imunoterapie.

S-au analizat datele medicale din foile de observație clinică ale pacienților în urma selecției acestora pe baza unor criterii:

Criteriile de includere au fost:

- Melanom malign confirmat histopatologic
- Stadiul bolii I-IV
- Status bun de performanță ECOG 0-2
- Probe biologice care să permită efectuarea tratamentului (hemogramă, probe hepatice, probe renale în limite normale)
- Pacienți care și-au exprimat consimțământul de a efectua tratament multimodal.

Criteriile de excludere:

- leziune cutanată fără confirmare histopatologică
- status de performanță ECOG 3-4

Pacienții care au îndeplinit criteriile de includere în studiu au fost incluși în prelucrarea statistică propusă. Analiza statistică pentru o parte din date a fost realizată cu ajutorul programului SPSS 23 pentru Windows. Au fost analizate următoarele date recoltate: corelații legate de distribuția pe grupe de vârstă, sex, date anatomo-patologice care cuprind infiltratul limfocitar, invazia vasculară, necroza tumorală, ulcerația, dimensiunea tumorală, nivelul Clark, indicele Breslow, timpul până la progresia bolii (PFS) care a fost definit ca intervalul de la diagnostic până la progresia bolii sau decesul survenit din orice cauză; supraviețuirea generală definită ca intervalul de la diagnostic până la decesul survenit din orice cauză. Curbele de supraviețuire au fost calculate folosind metoda Kaplan Meier. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic dacă valoarea lui p a fost sub 0,05. Au fost analizate și date biochimice referitoare la nivelul glicemiei, lactat dehidrogenazei, indici prognostici pentru modificările metabolice survenite în dinamica tratamentului.

În plus, în studiu au fost analizați parametrii de stres oxidativ care vor fi prezentați pe larg ca metodologie de lucru în capitolul următor. Acești parametri au fost utilizați în vederea

monitorizării metabolismului oxigenului cu scopul de a identifica eventualele reprogramări metabolice asociate melanomului malign.

Rezultate și discuții

Caracteristicile pacienților sunt sumarizate în tabelul următor.

Caracteristicile pacienților	N
Vârsta (mediană)	60 ani
Distribuția pe stadii	
IA	2 (2,94%)
IB	6 (8,82%)
IIA	8 (11,76%)
IIB	10 (14,70%)
IIC	6 (8,82%)
IIIA	4 (5,88%)
IIIB	6 (8,82%)
IIIC	10 (14,72%)
IV	16 (23,52%)
Subtipul histopatologic	
MM extensiv in suprafata	38,23%
MM nodular	29,41%
MM polipoid	8,82%
MM tumorigenic	8,82%
MM acral lentiginos	8,82%
MM cu celule alungite	2,94%
MM coroidian	2,94%

Tabel 1. Caracteristicile pacienților

Pacienții înrolați în studiu au avut o distribuție cuprinzând toate stadiile evolutive ale bolii și toate subtipurile histopatologice.

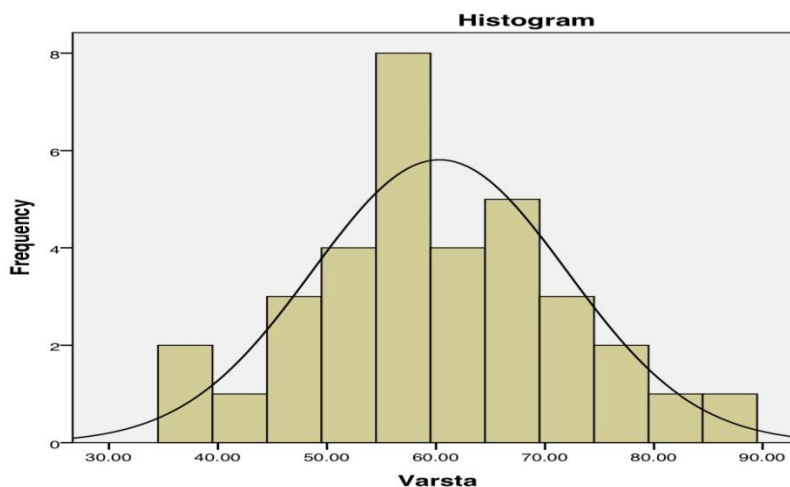


Figura 1. Distribuția pe grupe de vârstă a pacienților incluși în lotul de studiu

Așa cum s-a menționat, în studiu au fost înrolați 68 pacienți cu diagnosticul de melanom malign cutanat. Datele statistice obținute sunt prezentate în cele ce urmează. Distribuția pe grupe de vârstă reprezentată grafic este de tip gaussian, pacienții investigați s-au regăsit distribuiți în toate categoriile de vârstă, cu un maxim între 50-60 ani. (Figura 1)

Diferențele legate de distribuția pacienților în funcție de sex sunt foarte mici. Din totalul pacienților înrolați în studiu, 54% au fost de sex masculin și 46 % au reprezentat femei. Studiile următoare au fost concentrate pe modificările histo-patologice ale tumorilor provenite în urma tratamentului chirurgical. Datele preluate din rezultatele patologice arată că la 83% din pacienți a fost prezent infiltratul limfocitar și la 77% din cazuri s-a detectat și invazia vasculară.

Pentru 75% din cazuri s-au observat fenomene de necroză ale țesuturilor tumorale, doar la o pătrime din lamele urmărite la microscop nu s-au evidențiat aceste transformări. Când privește ulcerarea, aceasta a apărut la jumătate din tumorile urmărite.

Cei mai mulți pacienți, 37,1% s-au prezentat cu tumori mari, încadrabile în stadiul T4b, procentele cele mai mici fiind cele corespunzătoare stadiului T1 a și b. Aceste date sunt destul de îngrijorătoare și demonstrează deficiența în sistemul de supraveghere medical primar, în educația pacienților și în greutatea cu care aceștia se investighează cu regularitate. Prezența în procent mare a cazurilor cu tumori mari denotă îngreunarea tratamentului, a răspunsului la acesta, a evoluției stării pacienților și, în egală măsură a încărcării sistemului de sănătate mult mai solicitat.

Indicele Breslow reprezintă grosimea tumorală maximă și, în funcție de valoarea sa, se stabilesc atât marginile exciziei chirurgicale, cât și stadiul tumoral. Acest parametru reprezintă mai bine zis adâncimea până la care celulele tumorale au pătruns în piele. Se măsoară în milimetri și este cel mai important factor în estimarea prognosticului unui melanom. Un melanom cu indice Breslow (cu grosime) sub 1 mm este considerat un melanom subțire și are un prognostic bun. Indicele Breslow se referă doar la grosimea tumorii din piele. Nu da nici o informație despre prezența sau absența metastazelor de melanom.

Diagnosticul histo-patologic al unui melanom nu este complet fără precizarea indicelui Breslow. Pe baza analizei făcute pe un număr foarte mare de cazuri de melanom, Comitetul American pentru Cancer (AJCC) a prezentat o statistică legată de supraviețuirea la 5 ani a acestor pacienți. Astfel, 95-100% din pacienții cu melanom cu o grosime sub 1 mm supraviețuiesc la 5 ani de la diagnostic. În schimb, doar jumătate din cei cu melanom mai

gros de 4 mm supraviețuiesc la 5 ani de la diagnostic. Analiza statistică efectuată pe pacienții înrolați în studiul nostru a demonstrat existența unui indice Breslow mediu 5,14 (Figura 4.9), majoritatea pacienților intrând astfel într-o zonă de risc crescut legat de invazia ganglionară și metastazare. (11-13).

Urmărindu-se pacienții prin analiza datelor survenite din fișele de observație, s-a constatat că intervalul mediu de progresie al bolii a fost de 60 luni.

Daca se investighează statistic diferențele între timpul înregistrat până la progresia bolii în funcție de sexul pacienților se constată că nu există modificări date de aceste criterii.

Analiza histo-patologică indică pentru fiecare pacient stadiul infiltratului limfocitar. Procesând aceste date statistic, se înregistrează valori cu diferențe semnificativ statistice privind timpul până la progresia bolii în favoarea pacienților care au prezentat infiltrat limfocitar.

S-a urmărit și calculat statistic rolul invaziei vasculare în evoluția melanomului malign. Datele obținute arată că la pacienții cu invazie vasculară timpul până la progresia bolii a fost de 26 luni, spre deosebire de cei la care nu s-a identificat invadarea structurilor vasculare, unde timpul până la progresia bolii a fost mai mare de 61 luni.

Prezența fenomenului de necroză redat mai jos determină modificarea semnificativ statistică a intervalului de timp până la progresia bolii. Pacienții la care este prezentă necroza tumorală prezintă o valoare medie de 24 luni până la progresia bolii spre deosebire de cei care nu au prezente celule tumorale necrozate.

Ulcerarea, privită ca pierdere de substanță la nivelul pielii ce poate în particular afecta mai multe straturi cutanate (epiderm, derm, hipoderm) având cauza existența melanomului malign, a fost în continuare urmărită ca factor de prognostic în determinarea timpului până la progresia bolii la pacienții înrolați în studiu.

Diferențele calculate statistic arată că mediana timpului la pacienții fără prezența ulcerării a fost de 58 luni versus 30 luni la pacienții cu modificări tegumentare ulcerative. Când privește procesul de invazie ganglionară, pentru lotul luat în studiu, mediana supraviețuirii este de 60 luni versus 28 luni la pacienții cu invazie ganglionară.

Diagnosticarea melanomului poate fi dificilă chiar și pentru un dermatolog cu experiență întrucât simptomele și semnele acestei afecțiuni nu sunt întotdeauna evidente. Acest studiu efectuat pe un lot relativ mic de pacienți internați și tratați în Institutul Oncologic București a avut scopul de a identifica factori prognostici utili clinicianului în vederea monitorizării eficienței tratamentului, urmării progresiei bolii. Astfel, am observat că nu există diferențe între sexul pacienților, dar apar modificări semnificativ statistice legate

de prezența infiltratului limfocitar, invazia vasculară, necroza tumorală, ulcerația, invazia ganglionară.

Examenul anatomo-patologic oferă certitudinea diagnosticului de melanom. Sunt precizate grosimea tumorii (indice Breslow), cât și nivelul Clark, markeri importanți pentru prognostic.

Factorii principali în evoluția și prognosticul melanomului reprezintă:

- sexul: femeile au un prognostic mai bun decât bărbații
- vârsta avansată
- localizarea: Kopf a demonstrat că melanoamele localizate la nivelul capului, trunchiului și gâtului au un prognostic nefavorabil, implicând o grosime mai mare a tumorii, comparativ cu cele de la nivelul membrelor.
- indice Breslow –principalul factor în stabilirea prognosticului și a stadializării
- indice Clark
- ulcerația tumorii
- regresia tumorală reprezintă factor de prognostic negativ
- prezența infiltratului limfocitar intratumoral reprezintă factor de prognostic pozitiv
- neurotropismul melanomului crește riscul de recidivă
- invazia angiolimfatică crește riscul de metastazare
- mitozele mai frecvente de 6/mm reprezintă un factor de prognostic negativ
- invadarea ganglionară și ruperea capsulei
- prezența bolii metastatice de la diagnostic

Metabolismul cancerului a fost intens studiat, datele obținute precedând rezultatele asociate descoperirii oncogenelor, a genelor supresoare tumorale, a biologiei moleculare. În metabolismul cancerului activitățile reprogramate îmbunătățesc capacitatea celulară de a oferi un avantaj selectiv în timpul tumorigenezei. Majoritatea activităților reprogramate susțin supraviețuirea celulară și în condiții de stres, sau permit proliferarea celulară în condiții patologice ridicate. (14-16)

Termenul de reprogramare metabolică poate fi utilizat pentru a descrie căile metabolice convenționale ale căror activități sunt îmbunătățite sau suprimate în celulele tumorale în raport cu țesuturile benigne, ca o consecință a mutațiilor genetice și / sau a altor factori. Dintre aceste căi reprogramate se pot menționa transformările metabolice din tipul anaerob în cel aerob, creșterea biosintezei proteinelor, metabolismul 1-carbon, menținerea balanței redox. (17-19)

Noi abordări pentru a evalua metabolismul în tumorile vii pot îmbunătăți capacitatea noastră de a înțelege modul în care reprogramarea metabolică este definită și identificarea căilor care reprezintă priorități / oportunități în vederea îmbunătățirii tratamentului și îngrijirii pacienților cu cancer. Având în vedere aceste aspecte, pentru lotul investigat au fost urmăriti parametrii metabolismului energetic pornind de la nivelul inițial al glicemiei până la determinarea lactatului, produs în urma glicolizei. Datele obținute (Figura 2) arată că la inițierea tratamentului pacienții aveau valori normale care s-au menținut și la sfârșitul investigațiilor asociate tratamentului. (20-23)

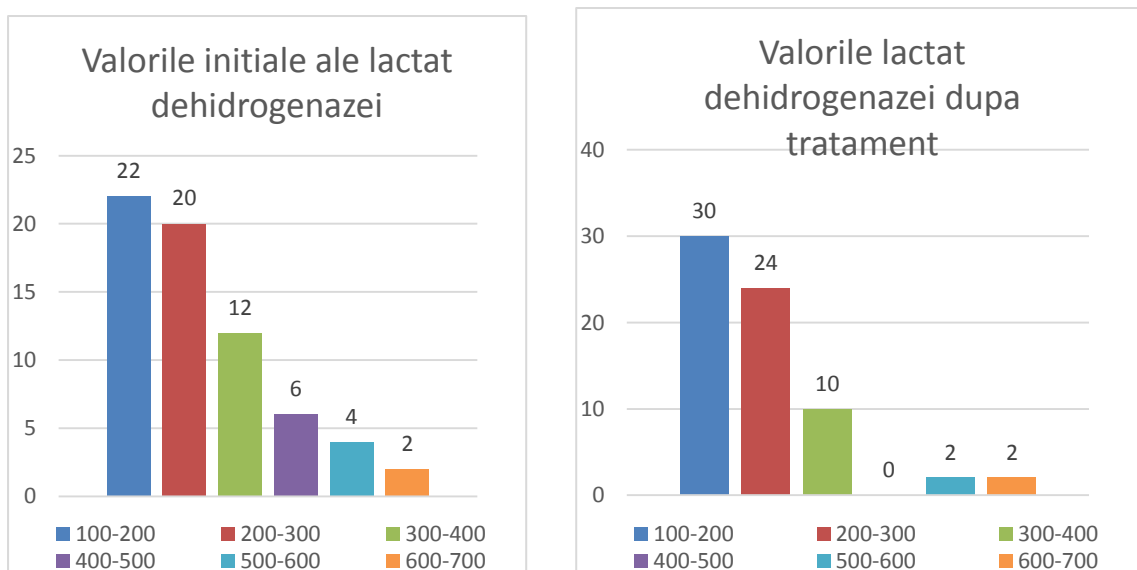


Figura 2. Valorile LDH la inițierea și finalul tratamentului

Țintirea metabolismului lipidic

În vederea identificării modificărilor care pot să apară în metabolismul lipidic, am monitorizat această cale metabolică prin urmărirea degradării oxidative a lipidelor.

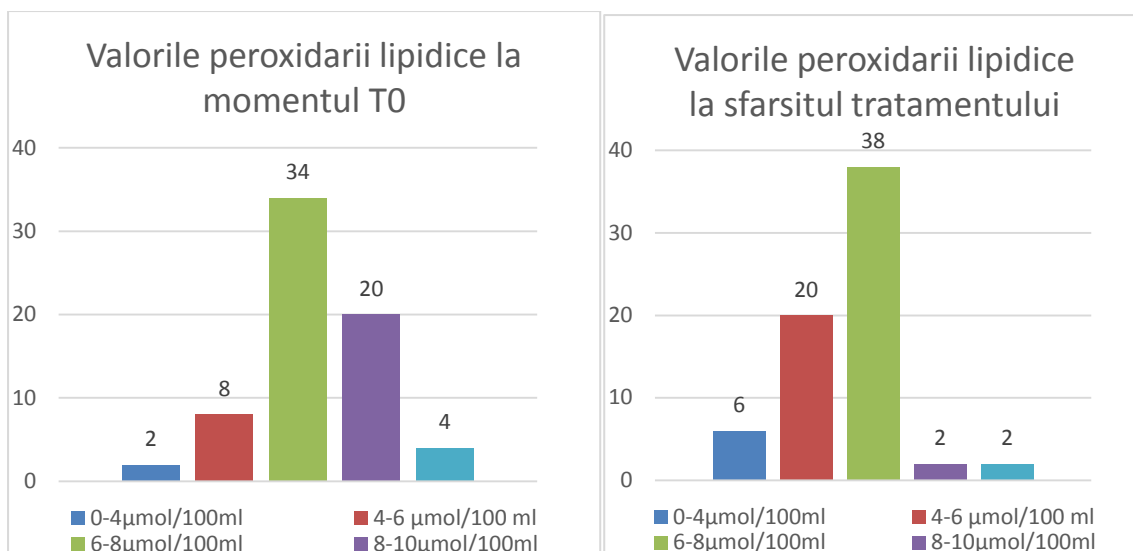


Figura 3. Valorile peroxidării lipidice

Celulele tumorale sunt expuse continuu degradării oxidative. Peroxidarea lipidică este o reacție care reflectă modificările lipidelor constituente și circulante sub acțiunea speciilor reactive de oxigen. Datele obținute prin investigarea pacienților la începutul și sfârșitul tratamentului aplicat arată o creștere a degradării oxidative a lipidelor ca urmare a atacului survenit asupra dublelor legături din structura acizilor grași polinesaturați constituenți. Atunci când substratul este epuizat, reacția se diminuează. (Figura 3) (24-26),

Țintirea metabolismului proteic

O serie de dovezi experimentale indică faptul că metabolismul sulfului poate fi reprogramat în cancer. Astfel, celulele canceroase au capacitatea de a regla absorbția cisteinei prin monitorizarea transcripției transportorului acesteia, precum și a ratei crescute de utilizare a glutaminei de către celule. De fapt, nu mai puțin de 30% din glutamina importată părăsește celula prin transportorul ei ca glutamat, în timp ce restul se schimbă metabolic în cisteină. În concordanță cu utilizarea lui intensă de către celulele canceroase, cisteina s-a dovedit a fi cel de-al doilea aminoacid cel mai mult metabolizat și rapid epuizat în comparație cu țesutul normal, spre exemplu. Cisteina este utilizată în metabolismul celulelor proliferative în mai multe scopuri, printre care se numără: biosinteza glutatationului și a clusterelor de sulf - fier, biosinteza hidrogenului sulfurat cu funcții complexe și care nu sunt încă pe deplin elucidate în fiziologia celulară, protecția antioxidantă asociată stresului oxidativ, creșterea respirației mitocondriale, protecție împotriva apoptozei, facilitarea angiogenezei. (27-29)

Acțiunea metaboliților activi ai oxigenului la nivelul proteinelor structurale sau enzimatică determină denaturarea acestora. Interacțiunile cele mai frecvente apar cu grupările tiolice proteice, cu formarea radicalilor tiil care, la rândul lor, pot suferi dimerizări sau oxidări cu formare de disulfuri, respectiv derivați ai acizilor sulfonici. (30)

Un factor hotărâtor în această reacție de oxidare a gruparilor –SH proteice de către SRO este cel steric. Expunerea grupărilor tiolice din proteine este esențială. Prin degradarea oxidativă se inhiba activitatea enzimatică ca urmare a modificării centrului catalitic activ (datorită oxidării grupărilor tiolice sau hemului, dar și prin degradări oxidative ale ciclurilor aromatice din structura unor aminoacizi). Proteinele structurale se inactivează datorită modificărilor induse de reacțiile de polimerizare, ramificare sau scindare indusă lanțurilor polipeptidice de către SRO. (31-32)

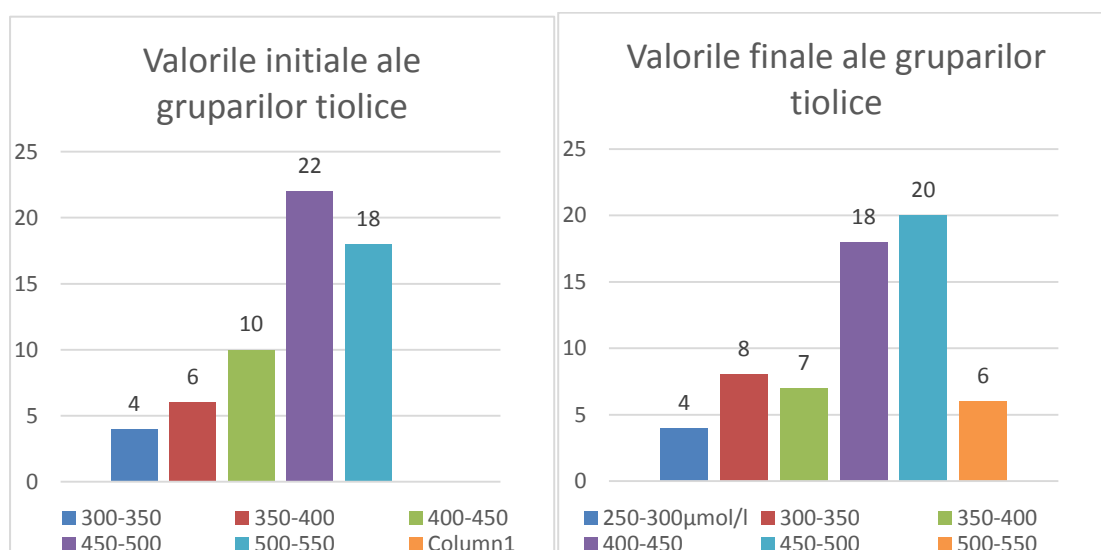


Figura 4. Valorile inițiale și finale ale grupărilor tiolice

Pentru a vizualiza producerea în exces de cisteină am determinat grupările totale tiolice, ca măsură a degradării oxidative a proteinelor conținând sulf. Rezultatele obținute în urma determinărilor efectuate demonstrează o creștere a nivelului tiolilor totali. (Figura 4). Putem să afirmăm că, spre deosebire de reacția de peroxidare lipidică unde se înregistrează o diminuare a valorilor, posibil prin suprimarea substratului reacției, reprezentat de acizii grași polinesaturați, în cazul reacției de degradare oxidativă a proteinelor nu se înregistrează diminuarea intensității reacției. Nivelul proteinelor supuse degradării oxidative nu scade prin lipsa substratului reacției, acesta din urmă este alimentat continuu fie prin sinteza de proteine

reprogramate metabolic, fie prin exces de proteine cu sulf care au acțiune antioxidantă și sunt produse în vederea susținerii echilibrului redox. (33)

Efectul diferiților micronutrienți

Efectul diversilor micronutrienți - vitamine și urmele de metale - asupra creșterii tumorii este un domeniu de cercetare intens explorat metabolic. Micronutrienții sunt prezenți ca și cofactori ai diverselor enzime și îndeplinesc roluri complexe neelucidate pe deplin în reglarea circuitelor metabolice celulare, dar și a transducției semnalelor. Este binecunoscut că nivelurile mici ale unor metale, cum ar fi zincul, cuprul, sunt modificate în celulele canceroase în comparație cu țesutul normal. Nivelurile de cupru, în special, pot fi crescute de 2–3 ori în tumorile mamare și ovariene, precum și în leucemie. (34-36) S-a demonstrat că pentru activarea ERK determinată de BRAFV600E în celule de melanom, ar fi necesar cupru, iar efectul epuizării acestuia influențează activarea constitutivă a ERK. (37)

Țintirea balanței redox

Celulele canceroase au plasticitate metabolică și își pot schimba profilul metabolic în timpul tumorigenezei și metastazării. Astfel, este posibil ca celulele canceroase să dezvolte rezistență la inhibarea unei anumite căi metabolice prin exprimarea unor izoforme proteice alternative sau căi compensatorii. (12) Prin urmare, o strategie rațională de tratament al cancerului ar trebui să implice vizarea simultană a mai multor căi metabolice sau numai o anumită cale metabolică în combinație cu terapii oncogene sau de semnalizare. (38) Pentru a contrabalansa creșterea producției de ROS în timpul tumorigenezei și metastazelor, celulele canceroase își cresc capacitatea antioxidantă. Astfel, o abordare terapeutică suplimentară este de a viza metabolismul redox, și anume dezactivarea selectivă a capacității antioxidante a celulelor canceroase provocând niveluri crescute de ROS și inducerea morții celulare. (39)

Datele obținute demonstrează instalarea stresului oxidativ, ceea ce înseamnă un dezechilibru între producerea speciilor reactive de oxigen, în detrimentul sistemelor naturale de antioxidanți care au capacitatea de a le reduce. (Figura 5) Aceste rezultate sugerează că, probabil, dezactivarea capacității antioxidante în celulele canceroase și creșterea nivelului ROS poate fi benefică în prevenirea metastazelor, supozitii care ar trebui intens studiate în continuare.

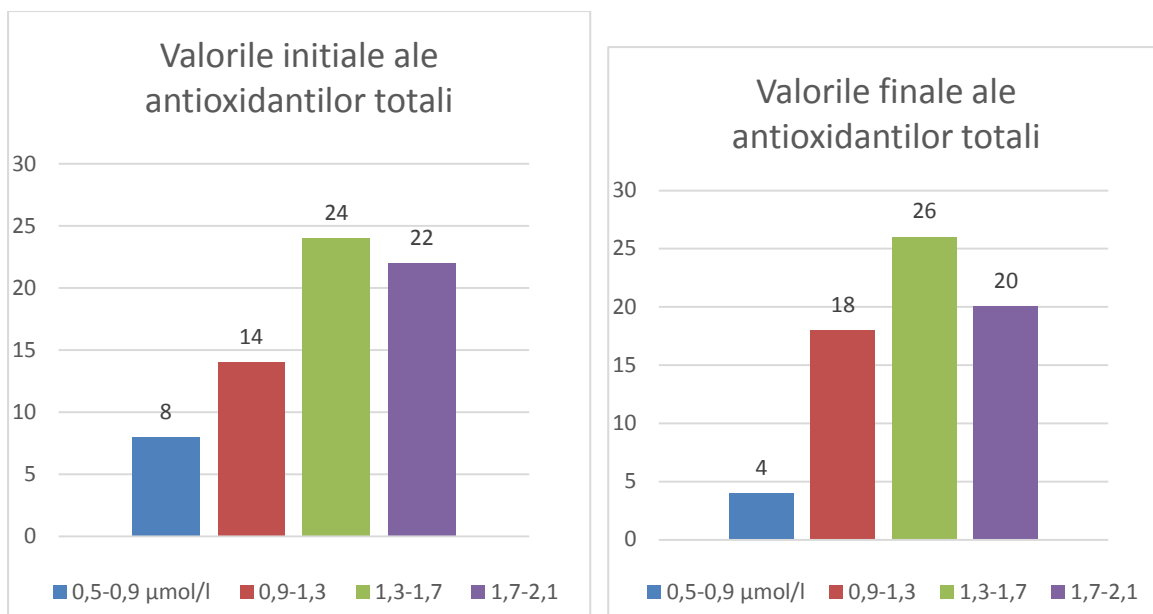


Figura 5. Valorile inițiale și finale ale antioxidantilor totali

Am încercat să evaluăm schimbările metabolice asociate cu creșterea și dezvoltarea tumorii folosind parametri biochimici care măsoară produsele finale ale degradării oxidative a lipidelor, proteinelor, parametrii implicați în menținerea echilibrului redox. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate și pe baza acestora putem spune că o peroxidare crescută în dinamica monitorizată poate reprezenta o creștere a metabolismului lipidic, dar și o distrugere oxidativă dată de ROS. Peroxidarea lipidelor este un proces metabolic natural în condiții normale și este una dintre cele mai investigate consecințe ale acțiunilor ROS asupra structurii și funcției membranei. Hidroperoxizii lipidici și produsele oxigenate ale peroxidării lipidelor, precum și inițiatorii peroxidării lipidelor (de exemplu, ROS) participă la transducția semnalului, controlul proliferării celulare și apoptoză. Pe de altă parte, invazia cancerului, precum și răspunsul inflamator la cancer pot induce, de asemenea, peroxidarea lipidelor în țesutul adiacent non-malign inducându-se răspuns care să determine creșterea peroxidării lipidelor, și generarea produsilor citotoxici ai peroxidării lipidice. Homeostazia lipidică poate fi menținută numai dacă excesul de lipide pe care celula le-a preluat sau sintetizat poate fi metabolizat sau transportat în afara membranei celulare (40). Acești produși de peroxidare a lipidelor se leagă covalent de histidina, cisteina sau de reziduurile de lizină ale proteinelor prin aditie chimică de tip Michael rezultând alterarea structurală și afectarea funcțiilor acestor reziduuri de proteine. (41) Există astfel o relație directă între nivelul de peroxidare lipidică și atacul oxidativ asupra proteinelor (Figura 5). Acestea, în exces ca urmare

a proceselor de reprogramare metabolică, vor fi un substrat accesibil pentru reacțiile inițiate de ROS

Putem să afirmăm că un metabolism îndreptat în principal către sinteza și utilizarea proteinelor va produce în exces compuși ușor de modificat oxidativ. Prin instalarea unui dezechilibru în echilibrul redox, apărând mai precis un stres oxidativ, celulele tumorale vor produce în exces proteine cu acțiune antioxidantă, acestea la rândul lor, conținând sulf vor fi susceptibile la atac oxidativ. Astfel, apare o relație dublă cauză-efect, fiind foarte dificil de identificat dacă aceste transformări sunt cauza sau efectul modificărilor maligne. Nivelul total de antioxidanți non-enzimatici, așa cum s-a înregistrat, crește odată cu dezvoltarea tumorii și se modifica funcție de răspunsul la tratament. (42-45)

Reprogramarea metabolică este esențială pentru biologia celulelor maligne, în special pentru capacitatea lor de a supraviețui și de a crește folosind căi metabolice convenționale pentru a produce energie, sintetiza precursorii biosintetici și menține echilibrul redox. Poate fi rezultatul mutațiilor genelor supresoare tumorale, ceea ce duce și la activarea anumitor căi de semnalizare și a rețelelor transcripționale. Căile metabolice reprogramate sunt esențiale pentru supraviețuirea și creșterea celulelor canceroase. Activitățile frecvent reprogramate includ cele care permit celulelor tumorale să utilizeze substanțe nutritive abundente pentru a produce ATP, pentru a genera precursori biosintetici și macromolecule și pentru a face față și a tolera stresul asociat cu malignitatea (de exemplu, stresul redox și hipoxia).

Noile abordări pentru evaluarea metabolismului în tumorile vii la om și șoareci pot îmbunătăți capacitatea noastră de a înțelege modul în care este definită reprogramarea metabolică și identificarea căilor care reprezintă priorități / oportunități de îmbunătățire a tratamentului și îngrijirii pacienților cu cancer devine o provocare și o necesitate.

Rezumând datele obținute putem spune că acest concept dedicat schimbărilor metabolice ale celulelor canceroase și supus atenției comunității științifice, continuă să dezvăluie noi conexiuni între reacțiile inițiate de consumul de nutrienți și starea tumorigenică. Mai mult, studiul metabolismului cancerului nu numai că identifică diferite căi de carcinogeneză, dar dezvăluie și noi principii despre modul în care biochimia metabolismului poate furniza informații pentru identificarea mecanismelor legate de creșterea, proliferarea și diferențierea celulelor. În plus, este timpul să găsim noi ținte moleculare, metabolice, care să reprezinte tratamente inovatoare în cancer.

Capitolul V Modelul experimental în studiul procesului de angiogeneză asociat melanomului malign

Cercetările în biologia bolii canceroase în general, a oncologiei experimentale în special, nu s-ar fi putut dezvolta fără principalul material biologic de lucru, animalul de experiență.

Odata cu înființarea Institutului Oncologic din București ca institut de cercetare cu paturi clinice a fost obținută și aprobată funcționarea unei biobaze în care, după importare, s-au întreținut la standarde internaționale diverse linii inbred (homozigote) de șoareci și șobolani, în vederea folosirii lor în cercetările de oncologie experimentală. Aceste linii de animale se obțin prin proceduri speciale care prevăd încrucișări repetate în vederea păstrării omogenității genetice. Aceasta asigură o serie de avantaje pentru studiile și cercetările de biologie moleculară, biochimie, dar și dezavantaje legate de greutatea extrapolării datelor la om, ele fiind considerate oarecum nenaturale. Pentru a păstra aceste linii pure cu regularitate se impun efectuarea unor teste pentru controlul purității genetice și a asigurării purității homozigoției, dar și a detectării timpurii a eventualelor mutații sau contaminări. Aceste analize se fac periodic și constau în testarea histocompatibilității prin:

- testul grefei de piele
- testul transplantului tumoral
- testul tipizării serologice
- testul hibridului F1

In afara liniilor inbred sunt intretinute si animalele outbred (heterozigote).

Tehnica de transplantare cu suspensii celulare tumorale

Tumora solidă se recoltează de la donator la fel ca în cazul transplantărilor cu grefoane, de la un animal din aceeași specie, linie și sex cu receptorul. Se recoltează în condiții sterile, se spală cu ser fiziologic steril, cu antibiotice pentru înlăturarea impurităților și elementelor sanguine provenite din vasele secționare care irigă tumora.

Prepararea suspensiei de celule în vederea transplantării poate fi făcută prin mai multe metode, însă metoda mecanică de separare celulară este frecvent utilizată în laboratoarele de întreținere a tumorilor deoarece față de transplantul cu fragmente tumorale folosește suspensii celulare libere, care pot fi cuantificate și inoculate cu seringă, ușor și rapid în orice regiune anatomică a receptorului. Procedul tehnic constă în fragmentarea foarte fină a tumorii cu o foarfecă, până se obține o pastă ce se trece printr-un filtru dublu de oțel inoxidabil cu 80

ochiuri / mm². În timp ce se spală continuu cu o soluție izotonică sterilă pasta tumorală de pe sita inoxidabilă se presează ușor cu o spatulă de sticlă pentru a ușura trecerea celulelor prin ochiurile sitei. Suspensia celulară obținută este centrifugată la 1000 r.p.m., timp de 10 minute, apoi se îndepărtează supernatantul cu restul de celule distruse. Sedimentul celular se resuspendă într-o soluție izotonică sterilă și se determină apoi viabilitatea celulară prin testul de excludere a colorantului folosind albastru de tripan. Suspensia se ajustează la o concentrație celulară ce poate varia în funcție de histotipul tumoral utilizat pentru transplantare. În general, pentru întreținerea tumorilor subcutane, se utilizează o concentrație de $5-10 \times 10^6$ celule viabile pe animal, iar procentul de prindere a tumorii este de peste 90% la animalele inoculate.

Pentru menținerea unei viabilități cât mai mari, se recomandă ca toate manevrele de la recoltarea tumorii și până la obținerea și inocularea suspensiei celulare să fie executate pe gheață. (46)

Rezultate si discutii

De la început trebuie făcută următoarea precizare: biologia tumorilor maligne ale animalelor de experiență nu se suprapune peste cea a cancerelor umane. Tumorile maligne animale au o capacitate spontană de metastazare mult redusă în comparație cu cele umane. Ritmul de creștere al cancerelor la animal este mult mai rapid (adaptat la durata medie de viață a speciei). Experimental, deși se încearcă să se reproducă cât mai fidel condițiile din patologia tumorală umană, se realizează artificial și, din acest motiv, extrapolarea rezultatelor la om nu este întotdeauna posibilă. Cu toate acestea, cercetările experimentale pe animal reprezintă singura cale valabilă de descifrare a numeroaselor procese implicate în apariția și evoluția tumorilor maligne. (47)

Dezvoltarea tumorilor este consecința creșterii numărului absolut al celulelor tumorale și survine atunci când rata proliferării celulelor tumorale o depășește pe cea a pierderilor. La gazdele histocompatibile, majoritatea tumorilor transplantate devin clinic evidente aproximativ după 7 zile, la 3-4 săptămâni fiind necesară recoltarea tumorilor și repasarea lor.

În tumorile experimentale numărul factorilor care pot da rezultate eronate este foarte mare. Din aceste motive se impune alegerea celui mai adecvat model experimental, iar extrapolarea în clinica umană a rezultatelor obținute trebuie făcută cu prudență și simț de răspundere. În lucrare a fost utilizat un model experimental de melanom malign murin care s-a dezvoltat în timp în Biobaza Institutului Oncologic Bucuresti. Acest model utilizează

șoareci inbred C57Bl/ 10 sau C57 Bl/6, diferențele sunt date în principal de dimensiunile animalelor purtătoare. Pentru a obține un model in vivo am folosit șoareci C57bl/6 (șoareci inbred) recunoscuți în literatura de specialitate ca purtători de melanom malign cutanat.

Tumorile experimentale au fost obținute după inocularea în flancul drept a 10^6 celule/ml provenite din culturi. După 14 zile s-au obținut tumori intens pigmentate, bine încapsulate, cu o consistență flască și creștere locală invaziv infiltrativă în musculatura subiacentă.

Metastazele au survenit la intervale de timp diferite, între 17 și 49 zile

Capitolul VI Caracterizarea și identificarea biochimică *in vivo* a procesului de angiogeneză

Studiul nostru s-a desfășurat in vivo pe animale purtătoare de tumori și anume melanom malign B16. Animalele (șoareci C37Bl/6) provin din Biobaza Institutului acreditată de a furniza material biologic odata cu înființarea din 1964.

Animalele de experiență au fost împărțite în două loturi, unul martor netratat și unul la care s-a aplicat un tratament cu Bevacizumab timp de trei luni, cinci zile pe săptămână, administrându-se 15 mg/kg corp anticorp monoclonal suspendat în soluție salină 0,2 ml administrat intravenos (în vena cozii). Administrarea a început din ziua a 15-a de la inocularea tumorii.

Așa cum am prezentat anterior, melanomul malign B16 este o tumoră experimentală, ușor reproductibilă, care oferă o serie de avantaje unui model de lucru, fiind o tumoră ușor transplantabilă, utilizând celule de referință menținute în cultură. Tumora este menținută până în prezent prin grefări repetate subcutan la șoareci inbred C57Bl/6 sau C57Bl/10. Prezintă o perioadă de latență mare de până la 15 zile și un procent de prindere a grefelor foarte bun de 90%. După injectarea intravenoasă a celulelor de melanom B16 se pot obține metastaze pulmonare. Spre deosebire de melanomul uman care are o capacitate ridicată de metastazare, fără specificitate de organ, melanomul B16 murin are o afinitate selectivă pentru pulmon.

Melanomul B16 exprimă multiple antigene, fiind utilizat și în testarea diferitelor protocoale de imunoterapie.

În flancul drept al animalelor de experiență s-au inoculat în jur de 1×10^6 celule per ml mediu de cultură. Șoarecii, în număr de 20, au fost împărțiți în două loturi și anume lotul tratat și lotul martor netratat. Toți au fost inoculați cu celule tumorale. Urmărirea lor a început din ziua a 15-a de la grefa tumorală, adică după 2 săptămâni. Din acest moment, s-a administrat Bevacizumab în doză unică săptămânală 15 mg/kg corp doar la lotul tratat. S-au

efectuat sacrificări în vederea recoltării materialului biologic după 2, 3, 4 și 5 săptămâni de la inoculul tumoral. S-a recoltat sânge integral prin puncție cardiacă și țesut tumoral. Recoltarea se face după anestezia totală.

Sângele astfel obținut se ține 15 minute la 37°C în vederea exprimării serului și se centrifughează 20 minute la 1500 rpm. Se separă serul care poate fi ținut la congelator la -20°C până la prelucrarea biochimică.

Țesuturile recoltate se spală în ser fiziologic și se triturează, apoi se omogenizează în același ser, în proporție 1/5 v/v. Omogenatul se centrifughează la 3000 rpm timp de 30 minute și se resuspendă în ser fiziologic. Supernatantul astfel obținut este folosit în testele viitoare.

S-au efectuat o serie de teste biochimice care vizează metabolismul oxigenului. În acest scop s-a determinat indicele de peroxidare lipidică, evaluat prin măsurarea concentrației malonaldehidei serice, produs final al degradării hidroperoxizilor lipidici proveniți din reacțiile exercitate de speciile reactive ale oxigenului asupra lipidelor totale. Metoda se bazează pe formarea unui aduct roșu (MDA-TBA₂) care prezintă un maxim de absorbție la 532 nm înregistrat la un spectrofotometru Analytic Yena Specord 210. Soluțiile utilizate sunt preparate proaspăt utilizând apă genetic pură provenită de la un dispozitiv Milli-Q, iar substanțele utilizate, acidul tiobarbituric, acidul acetic, acid tricloracetic, provin de la Merck și au gradul de puritate necesar testelor. (48-50)

Determinarea peroxizilor lipidici s-a efectuat din ser și țesut tumoral. Determinarea tiolilor albuminici s-a efectuat din aceleași probe biologice cu scopul măsurării extensiei atacului oxidativ exercitat de speciile reactive ale oxigenului asupra proteinelor.

Grupările tiol-albuminice SH au fost determinate prin reacția cu acidul 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic), reactiv Ellman. Reactivii se prepară proaspăt, utilizând compuși chimici proveniți de la Merck. Determinarea tiolilor albuminici s-a efectuat din ser, țesut tumoral, tot printr-o metoda spectrofotometrică. (51)

Producerea în exces a speciilor reactive de oxigen este contracarată in vivo printr-o serie de mecanisme de apărare antioxidantă endogenă. Pentru evaluarea cât mai corectă a eficienței tratamentului inițiat anti-angiogenic, am introdus și o reacție biochimică de măsurare a acestei abilități antioxidante și anume reacția FRAS (ferric reducing ability of serum). Reacția măsoară reducerea complexului ion feric-2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) la un produs colorat.

Metoda, care măsoară efectul antioxidant combinat al antioxidantilor non-enzimatici din fluidele biologice, este utilă în controlul indicelui de rezistență la distrugerile oxidative.

La pH scăzut, când complexul Fe^{3+} - tripiridil triazina este redus la Fe^{2+} de antioxidanții din probă, se formează o colorație albastru-intens cu λ_{max} 593 nm. În această metodă, se folosește un exces de ioni Fe^{3+} , iar factorul limitator al formării complexului, prin urmare și al culorii, este antioxidantul (reducătorii din plasmă). (189-190)

Rezultate si Discutii

Variatia parametrilor de metabolizare a oxigenului in ser

Așa cum s-a menționat, probele au fost recoltate în dinamica creșterii și dezvoltării tumorale la lotul martor și în dinamica tratamentului la lotul tratat. Animalele din lotul martor au fost sacrificate la 3, 5, 10 și 15 săptămâni de la inoculare, momente care coincid și la lotul tratat, administrarea compusului cu acțiune anti-angiogenică începând din săptămâna 2 de la inoculare și efectuându-se până la săptămâna 15, având loc în aceeași dinamică.

Datele reprezentate prezintă o variație crescătoare în funcție de dezvoltarea tumorii la lotul martor. Peroxizii lipidici cresc proporțional cu masa tumorală și astfel se sugerează o activitate oxidativă crescută manifestată la nivelul lipidelor. Pentru lotul tratat există o modificare a profilului peroxidării lipidice. Astfel, dacă în primele momente ale evoluției tumorale, valorile sunt aproximativ la fel, după instituirea tratamentului anti-angiogenic, peroxidarea lipidică înregistrează o creștere mult mai mică, constantă. Valorile rămân în platou până spre sfârșitul tratamentului când creșterea înregistrată este aproximativ de două ori mai mare (200%) față de valoarea inițială, spre deosebire de lotul martor, unde creșterea este mai mică. Aceste valori sugerează pentru această etapă a investigațiilor o eficiență a tratamentului instituit.

Din serul recoltat în aceleași condiții, au fost determinate și grupările tiol albuminice, ca măsură a intensității atacului oxidativ asupra proteinelor.

Rezultatele obținute prin investigarea peroxidării lipidice sunt în asentimentul acestor idei din literatura de specialitate și sugerează rolul speciilor reactive de oxigen în concentrație mică de semnalizatori ai hipoxiei.

Valorile normale sunt cuprinse în intervalul de referință 370 – 450 $\mu\text{mol/l}$. Scăderea valorilor se corelează direct cu scăderea eficienței barierei antioxidante plasmatice realizate de gupările tiol.

În țesutul hepatic normal, valorile sunt diferite în funcție de lotul investigat. Astfel la lotul tratat, apare o creștere semnificativă a parametrului investigat față de lotul martor.

VII. Rolul semnalizator al speciilor reactive de oxigen în inițierea angiogenezei

Celulele tumorale menținute în cultură au fost tratate cu Bevacizumab în doze diferite (7.5 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ și 150 $\mu\text{g/ml}$) față de un flask în care au fost celule netratate folosite drept martor. Administrarea s-a efectuat prin adăugarea în mediul de cultură și menținerea timp de 12 ore a dozelor de Bevacizumab (doza 1= 7,5 $\mu\text{g/ml}$, doza 2= 100 $\mu\text{g/ml}$, doza 3= 150 $\mu\text{g/ml}$). Pentru început s-a urmărit posibila inducere a apoptozei la nivel celular ca urmare a acțiunii anticorpului monoclonal Bevacizumab asupra celulelor tumorale. Prin aceste teste încercăm să verificăm toxicitatea compusului asupra celulelor de testat și/sau eventuala sensibilitate a tratamentului aplicat.

Datele înregistrate, în timp real, la 48 ore acțiune a Bevacizumab în concentrații diferite arată creșterea producerii de radicali liberi. Acest fapt este semnalat de un vârf care se suprapune parțial cu controlul pozitiv, marcând creșterea nivelului ROS. Rezultatele se pot datora unui metabolism al oxigenului intensificat, dar este dificil a preciza dacă acesta se datorează neovascularizației sau a altor procese biochimice, metabolice reprogramate sau induse de prezența celulelor tumorale. Cert este că nu putem afirma că un tratament cu antiangiogenic la 48 ore determină diminuarea producerii speciilor reactive de oxigen.

VIII. Caracterizarea optică a procesului de angieneză consecutiv transformării maligne

Au fost investigate probe de țesut tumoral experimental obținut de la șoareci C57bl/6 purtători de melanom B16. Probele au fost recoltate în dinamica creșterii și dezvoltării țesutului tumoral la 14, 17 și 21 zile de la inoculare. După anestezierea animalelor efectuala cu cloroform s-a recoltat steril țesutul tumoral, introdus într-un criotub. Secționarea s-a efectuat cu ajutorul unui criotom. Secțiunile au fost immobilizate pe lame și fără colorare au fost investigate în sistemul dedicat.

În comparație cu viteza de propagare a ultrasunetelor (331 m/s în aer și 1430 m/s în apă), viteza luminii este extrem de mare (aprox. $3 \cdot 10^8$ m/s în aer și $2.25 \cdot 10^8$ m/s în apă). Prin urmare, decalajul temporal (în timp) dintre două unde (unda de referință și unda reflectată) provenite de la aceeași sursă după ce ele parcurg distanțe care diferă cu câțiva zeci de microni nu poate fi măsurat în mod direct, ci se apelează la tehnici de interferometrie. O metodă pentru a măsura întârzierea dintre două unde luminoase este interferometria prin coerență joasă care realizează coerența optică în domeniul reflectometriei. Interferometria prin coerență joasă a fost pentru prima dată dezvoltată în domeniul telecomunicațiilor, pentru măsurarea reflexiilor optice provenite de la defectele sau racordurile fibrelor optice.

Aparatura folosită în masuratori de tip OCT este compusă, în general, dintr-o sursă de radiație optică parțial coerentă, un montaj interferențial și un sistem de detecție. Acestora le este adăugat un sistem software de analiză, interpretare și reprezentare sub formă de imagini a semnalelor înregistrate. Prima instalație OCT a fost implementată utilizând ca sursă un laser în impulsuri de ordinul femto-secundelor, având un spectru de emisie larg, ceea ce implică o lungime de coerență scăzută. Radiația luminoasă de joasă coerență este caracterizată de o serie continuă de mici pulsuri ce au durată egală cu lungimea de coerență.

Rezultate și discuții

OCT realizează secțiuni transversale sau secțiuni tomografice ale microstructurii interne în țesuturile biologice. Este o tehnologie imagistică extraordinară deoarece permite în timp real măsurarea *in situ* a structurii țesutului cu rezoluție de 5 - 15 μm și o rezoluție cu 1-2 ordine de mărime mai mare decât cea a tehnologiilor convenționale de imagistică medicală (ecografia, rezonanța magnetică, tomografia computerizată).

Rezultatele obținute într-o primă fază surprind țesuturile modificate în dinamica creșterii și dezvoltării prin scanări la intervale de timp de la 0 la 225 secunde. Sensibilitatea de detecție nu este cea optimă, dar pe verticală se pot înregistra modificări biostructurale ale probelor investigate. Pentru a se obține imagini prin OCT de calitate ridicată, este necesar să se obțină sensibilități de detecție extrem de mari; aceasta este proporțională cu cantitatea de putere disponibilă în semnal și invers proporțională cu lățimea de bandă a detecției.

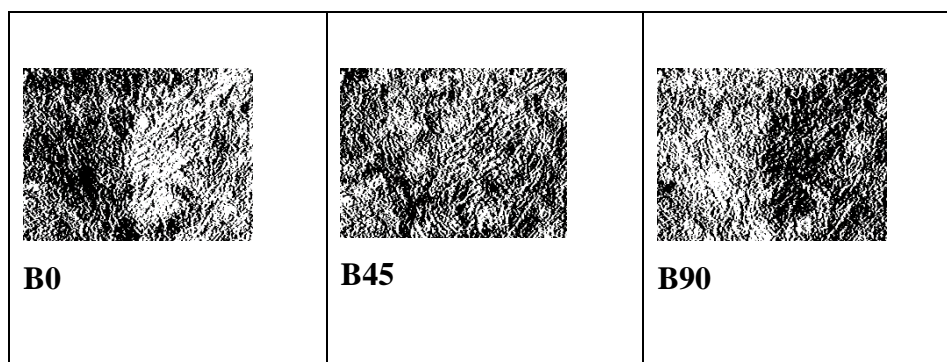


Figura 6. Dinamica detectării pentru proba B (14 zile de la inoculare)

Pentru a interpreta corect rezultatele obținute, am încercat să urmărim, pe orizontală transformările în dinamică la o singură probă, detectată în dinamica dată de timp și anume de captarea de date de la 0 la 90 secunde pentru proba investigată la 14 zile de la inoculare.

Măsurătorile optice au arătat că țesuturile transformate malign sunt sensibile în ceea ce privește rotația planului de polarizare. Odată cu creșterea modificărilor date de transformarea maligna are loc o deteriorare dramatică a acestor structuri; acestea nu pot fi identificate prin metoda polarimetriei laser. Imaginea trebuie să aibă o densitate a pixelilor suficient de mare pentru ca micile detalii să poată fi vizualizate la o rezoluție dată.

Biopsia tisulară este metoda principală folosită pentru diagnosticarea tumorilor. Este foarte important, atât pentru scop clinic, dar și pentru caracterizarea tumorilor în scop de cercetare, ca aceste probe de biopsie să fie perfecte, corect recoltate și să poată fi optim prelucrate. În egală măsură, este importantă și cantitatea de material biopsic recoltat, având în vedere alterarea acestuia după tratamentul chimio și / sau radioterapic aplicat, biopsia fiind unica sursă de țesut tumoral de la un pacient. De asemenea, o importanță majoră trebuie acordată și faptului că aceste țesuturi recoltate sunt necesare pentru: 1) diagnostic dat prin clasicele colorări hematoxilină-eozină (H&E), dar și posibile colorări imunohistochimice speciale în vederea identificării subtipurilor tumorale și 2) testări moleculare în vederea identificării pacienților care pot beneficia de terapii țintite specific unor mutații genice individuale.

Există astfel clar necesitatea crescută de a optimiza randamentul tumorii și de a minimiza fibroza contaminantă în probele obținute prin biopsie. Tomografia de coerență optică (OCT) este o tehnică și o modalitate de imagistică optică nedistructivă care oferă un volum tisular relativ mare, rapid, cu rezoluție de adâncime (~ adâncime de penetrare de 1-2 mm în funcție de proprietățile de împrăștiere a țesuturilor), imagini de înaltă rezoluție (<10 μm) de microstructură tisulară. OCT a fost aplicat cu succes la detectarea modificărilor structurale în multe sisteme de organe, inclusiv în sistemele cardiovasculare, gastrointestinale, oculare și pulmonare. Imagistica OCT poate fi utilizată pentru evaluarea micro-arhitecturii tisulare in vivo sau ex vivo. (55,56)

Rezultatele de etapă ale studiilor noastre demonstrează importanța calității materialului investigat. Așa cum se observă în tabelul de mai sus, este extrem de important de a se prelucra imediat țesuturile recoltate. Depozitarea și menținerea lor mai mult de 48 ore, fără o prelucrare în avans determină deteriorarea probelor, îngroșarea membranelor, pierderea proprietăților optice și obținerea acestor imagini greu de interpretat. Având în vedere că prin aceste probe am încercat optimizarea măsurătorilor și a tehnicilor de OCT, putem spune că, după câteva încercări nereușite, am concluzionat că timpul optim de înregistrare a datelor este la 24 ore, fără fixare în prealabil a țesutului în parafină sau alcool care ar putea induce erori și după uscarea probelor la o temperatură optimă, cea a camerei, fără uscare forțată în incubator.

Concluzii generale

Termenul de melanom a fost utilizat prima dată de Carswell în 1838. Melanomul malign face parte din categoria neoplaziilor cu malignitate înaltă ce se dezvoltă din melanocitele epidermice și, mai rar, din cele dermice, prezintă polimorfism clinic, evoluție capricioasă, poate afecta toate vârstele, fiind mai frecvent la femei; într-un număr mic de cazuri prezintă determinism genetic. Apariția la vârste tinere este în legătura cu expunerea excesivă la soare a întregului corp în perioada copilăriei și adolescenței și, nu în ultimul rând, distrugerea stratului de ozon.

Până acum câțiva ani, se considera că tratamentele anticanceroase eficiente duc la distrugerea celulele tumorale, prin angajarea mecanismelor apoptotice, sau mentinerea lor permanentă în faza G1 a ciclului celular. Mai recent, s-a observat că unii agenți anticanceroși pot induce alte forme de moarte celulară, cum ar fi necroza programată sau apoptoza mitotică provocată. Acest aspect poate fi deosebit de interesant deoarece: necroza s-ar putea dovedi utilă în eliminarea acelor celule canceroase care au dezvoltat rezistență la apoptoză și celulele canceroase sunt deosebit de sensibile la inducerea distrugerilor mitotice datorită instabilității lor genomice.

Studiul retrospectiv realizat a urmărit identificarea unor parametri clinici și biologici efectuați din ser și țesut tumoral în vederea stabilirii unor date utilizabile în monitorizarea eficienței tratamentului. Pornind de la date statistice s-a observat că nu există diferențe semnificative legate de sex sau vârstă, acești factori nu influențează cursul tratamentului și/sau al bolii. Infiltratul limfocitar, invazia vasculară, necroza tumorală și ulcerația sunt parametric importanți și, în funcție de gradul acestora, este necesară modificarea și adaptarea schemei terapeutice aplicate. În egală măsură, aceste date se corelează cu profunzimea tumorii și gradul ei de extindere.

Din punct de vedere biochimic, glicemia și lactat dehidrogenaza pot fi considerați parametri energetici. Aceștia nu s-au modificat semnificativ în cele două momente investigate, astfel putem să afirmăm că **dezvoltarea, creșterea și modificarea celulară în melanomul malign nu sunt pe deplin influențate de aceste căi metabolice, cu toate că datele din literatură nu confirmă datele obținute de către noi.** Cu siguranță, aceasta discrepanță apare ca urmare a unui număr relativ mic de pacienți investigați, într-un lot neomogen, cu multe particularități și doar cu două analize. Ne propunem ca pentru viitor acești parametri să fie intens corelați într-o dinamică anume aleasă pentru a confirma sau infirma rezultatele de etapă obținute.

Parametrii biochimici de stres oxidativ se corelează cu modificările metabolice legate de lipide, proteine, micronutrienți și balanța redox. Am înregistrat o **intensificare a metabolismului lipidic**, măsurând degradarea oxidativă a acestora, atât sinteza care asigură substratul reacției, cât și nivelul produșilor finali sunt crescuți sugerând o reactivare metabolică crescută la pacienții cu melanom malign.

Analiza degradării oxidative a proteinelor arată o intensificare a biosintezei proteinelor cu sulf, ceea ce poate fi o caracteristică a celulei transformate malign.

În studiile experimentale este deosebit de important a se alege corect și fiabil modelul experimental. Aceasta presupune studiul animalelor de experiență utilizate, urmărindu-se toate aspectele și datele furnizate de crescătorii acestora, cunoașterea metabolismului și a valorilor parametrilor fiziologici în totalitate, modul în care se realizează implantul tumoral. **Pentru a obține un model in vivo am folosit șoareci C57Bl/6 (șoareci inbred), recunoscuți în literatura de specialitate ca purtători de melanom malign cutanat. Tumorile experimentale au fost obținute după inocularea în flancul drept a 10^6 celule/ ml provenite din culturi. Metastazele au survenit la intervale de timp diferite, între 17 și 49 zile depinzând de pasajele efectuate, timpul de latență fiind mai mare la mai multe pasaje, sugerându-se pierderea agresivității tumorale prin grefările seriate.**

Încă din 1970 a fost lansată ideea că inhibarea angiogenezei tumorale poate constitui o metodă terapeutică în lupta contra cancerului. Ne-am propus identificarea rolului speciilor reactive de oxigen în cascada de semnalizare a procesului de angiogeneză și de a stabili mecanismele citotoxice bazate pe aceste specii. Pentru aceasta, a fost realizat un **model experimental in vivo la care inhibarea angiogenezei s-a efectuat cu un tratament cu Bevacizumab. Peroxizii lipidici cresc proporțional cu masa tumorală și astfel se sugerează o activitate oxidativă crescută, manifestată la nivelul lipidelor.** Se identifica asemănător profilului peroxidării lipidice, o creștere a atacului oxidativ asupra proteinelor în timpul creșterii și dezvoltării tumorale, datele confirmând rezultatele din literatura de specialitate care afirmă instalarea unui stres oxidativ asociat tumorii. **Pentru lotul tratat se înregistrează o scădere a valorilor tiolilor liberi, valori care încep să crească ușor și rămân în platou spre sfârșitul tratamentului și instalarea apoptozei și necrozei tumorale, concluzionând la faptul că melanomul malign are un potențial angiogenic ridicat, dar răspunde slab la tratamentul medical și metastazează foarte devreme.**

Eforturile în a stabili corect diagnosticul de melanom malign si nu numai, ci orice tip de cancer al pielii fără biopsii si interventii traumatizante reprezinta un scop al medicilor, aflat

intr-o continua desfasurare. Tomografia Optică Coerentă (OCT) este o metodă imagistică bazată pe interacția radiației optice provenită de la o sursă optică de coerență redusă cu obiectul investigat, interacție realizată într-un montaj de tip interferențial. **Completarea bazei informaționale a imaginii matricii Mueller (MMI) în cazul testelor efectuate pe probe biologice furnizează noi posibilități de diagnosticare a modificărilor patologice în macro-neomogenitățile tisulare,** dar și detectarea timpurie a modificărilor în structura colagenului, miozinei și a altor rețele fibrilare, care sunt baza arhitectonicii tesuturilor și preced apariția anomaliilor fizice diagnosticate clinic.

Bibliografie

1. Murray TJ, Robert Carswell: the first illustrator of MS, *Int MS J.* 2009 Sep;16(3):98-101.
2. Abbas O, Miller DD, Bhawan J Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol.* 2014 May;36(5):363-79
3. Globocan, The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved, March, 2019.
4. Forsea A.M., Del Marmol V., de Vries E., Bailey E.E., Geller A.C. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. *Br J Dermatol.* 2012;167:1124–1130
5. Pennello G., Devesa S., Gail M. Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:291
6. Lancaster,HO, Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *Med J Aust.* 1956;43(26):1082-7.
7. Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. *Cancer Incidence in Five Continents. Edition. Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160, Lyon: IARC. 2007; 65-76.*
8. J A Lee, J M Merrill , Sunlight and the aetiology of malignant melanoma: a synthesis , 1970 *Oct 31;2(18):846-51*
9. Armstrong BK, Kricker A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 1993;3(6):395-401.
10. Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, Bechara EJ, Halaban R, Douki T, Brash DE. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science.* 2015 ;347(6224):842-7.
11. 11.Marco Rastrelli, Saveria Tropea, Carlo Riccardo Rossi And Mauro Alaibac, Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification, *In Vivo* November 2014, 28 (6) 1005-1011;

12. G. J. Yoshida, Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34,111-120 2015
13. M. Keenan, J-T Chi, Alternative Fuels for Cancer Cells, *Cancer J.* 21(2): 49–55, 2015
14. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314
15. Seyfried, T.N.; Flores, R.E.; Po_, A.M.; D'Agostino, D.P. Cancer as a metabolic disease: Implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* 2014, 35, 515–527.
16. Vander Heiden, M.G.; DeBerardinis, R.J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell* 2017, 168, 657–669.
17. Li, Z.; Zhang, H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol. Life Sci.* 2016, 73, 377–392.
18. Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016, 23, 27–47.
19. Ward, P.S.; Thompson, C.B. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012, 21, 297–308.
20. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS, Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment, *Nature* 461 2009 109–113.
21. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16:619–634.
22. T. S. Cliff ,S. Dalton, Metabolic switching and cell fate decisions: implications for pluripotency, reprogramming and development, *Curr Opin Genet Dev.* 2017; 46: 44–49.
23. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2014; 92:90–101.
24. L. K. Borouhgs, R. J. DeBerardinis, Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth, *Nat Cell Biol.* 2015 ; 17(4): 351–359.
25. Wosko TJ, DT Ferrara, and LS Sartori. Histological comparison of the B16 melanoma and its F1 variant, 1984;. *Cancer Letters.* 24 (1): 57-63.
26. Carboneau M.A. Peroxides measurement in blood and plasma. *Clinic. Chem.* 1991;37, 1422-1428.
27. Janero D.R., *Free Rad. Biol. Med.* 9(6), 1990, 515-540, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury *Free Rad. Biol. Med.* 1990, 9(6), 515-540,
28. Romero, Fj et al. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 1680.
29. Ravin, Nomoto S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem* 1970;16:903-910

30. Cao, G.; Prior, R. L Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 1998, 44, 1309–1315.
31. Olson B, Li Y, Lin Y, Liu ET, Patnaik A., Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer Discov.* 2018 Nov;8(11):1358-1365.
32. Cheon DJ, Orsulic S. *Annu , Mouse models of cancer. Rev Pathol.* 2011;6:95-119
33. Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives., *Nat Rev Cancer.* 2017 Dec;17(12):751-765.
34. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S, Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery., *Biochem Pharmacol.* 2014 ; 87(1):150-61.
35. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):645–658
36. Jonasson, O., The viability of circulating cancer cells in experimental cancer. *Surg Forum.* 1958;9:577-80.
37. Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis., *Eur J Cancer.* 1973;9(3):223-7.
38. Anisimov VN., Effect of host age on tumor growth rate in rodents. *Front Biosci.* 2006 ;11:412-22.
39. Balani S, Nguyen LV, Eaves CJ. Modeling the process of human tumorigenesis.. *Nat Commun.* 2017 25;8:15422
40. Folkman J., "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors", *Annals of surgery* 175:409-416, 1972
41. Fidler I. J., Kerbel RS, Ellis LM, "Biology of cancer angiogenesis "Cancer: principles and practice of oncology. 6-th ed. Philadelphia(PA): Lippincott; p. 137-148, 2001.
42. Plank M.F., Sleeman B.D., Tumour-induced angiogenesis: a review, *J. Theoret. Biol.*, 5, 137-153, 2003
43. Duda D.G., Ancukiewicz M., Jain R.K., Biomarkers of angiogenic therapy: How do we move from candidate biomarkers to valid biomarkers", *Journal of Clinical Oncology*, Volume 28, 2, 183-184, 2010
44. Ihle J.N Signal transducers and activators of transcription,, *Cell*, 84:331-334, 1996, Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nature Medicine*, Vol. 9, Number 6, 677-684, 2003
45. Gupta, SC. Patchva D H, Park B, Koh W, and Aggarwal B.B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy *Antioxidants & Red. Singn*, 16 (11) 2011
46. Kerbel R.S., Tumor angiogenesis, *N. Engl.J. Med.*, 358:2039-2049, 2008.
47. Jouanneau J., Adhesion, motilite et migration cellulaires, *Cancerologie fondamentale*, Paris, John Libbey Eurotext, p. 53-60, 2005

48. Ellis LM, Fidler IJ (1996) Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 32:2451-2460
49. Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M., Hwu P., Schartzentruber D.J., Topalian S.L., Steinberg S.M., X.ChenH., Rosenberg S.A., A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for metastatic Renal Cancer, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 349, No 5, 427-434, 2003
50. S.R. Simon și W.B.Ershler – *JNCI*, vol.74 no.5, pp.1085-88, 1985
51. Halliwell, B , Gutteridge, JMC (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidants therapy. *Lancet*. 1, 1396.
52. Janero D.R., *Free Rad. Biol. Med.* 9(6), 1990, 515-540, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury *Free Rad. Biol. Med.* 9(6), 515-540,1990
53. Romero, Fj et al. (1992) The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. *J. Biol. Chem.* 267, 1680. 1992
54. Cao, G.; Prior, R. L Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 1998, 44, 1309–1315.
55. Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 1999, 26, 202–226
56. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 19:6122-6129, 2000