

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

***MOLECULE-CHEIE ÎN INIȚIEREA ȘI
PROGRESIA CANCERULUI
COLORECTAL
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. HINESCU MIHAIL-EUGEN**

**Student-doctorand:
NICULAE ANDREI-MARIAN**

2023

CUPRINS

Introducere.....	12
I. PARTEA GENERALĂ	
1. Elemente de fiziopatologie celulară în procesul de oncogeneză	16
1.1. Profilul metabolic al celulelor tumorale	16
1.2. Metabolismul glucidic al celulelor tumorale	17
1.3. Metabolismul lipidic al celulelor tumorale.....	18
1.4. Metabolismul proteic al celulelor tumorale.....	22
1.5. Metastazarea - diseminarea sistemică a celulelor tumorale maligne.....	23
2. Aspecte histopatologice, fiziopatologice și genetice în cancerul colorectal	31
2.1. Epidemiologia și aspectele histopatologice ale cancerului colorectal.....	31
2.2. Genetica în cancerul colorectal.....	35
2.3. Particularități metabolice ale celulelor tumorale în cancerul colorectal.....	38
2.4. Apoptoza și inflamația în cancerul colorectal	44
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	46
4. Metodologia generală a cercetării.....	48
4.1. Planul de lucru	48
4.2. Selecția pacienților	50
4.3. Probe biologice	51
4.4. Protocolul de colorație cu hematoxină-eozină și evaluarea histopatologică.....	51
4.5. Teste imunohistochimice pentru detecția instabilității microsatelitare și a expresiei CD36.....	52
4.6. Izolarea și evaluarea calității și a cantității acizilor nucleici	53
4.7. Identificarea statusului MSI prin PCR și analiza de fragmente	56
4.8. Identificarea statusului mutațional al genei KRAS	58
4.9. Identificarea statusului mutațional al genei BRAF, codoni 600/601	61
4.10. Identificarea expresiei microARN-urilor.....	64

4.11. Identificarea expresiei genice	66
4.12. Analiza statistică.....	68
5. Evaluarea expresiei genelor implicate în transportul acizilor grași și a microARN-urilor care țintesc aceste gene.....	70
5.1. Introducere.....	70
5.2. Material și metodă	70
5.3. Rezultate	71
5.4. Discuții	107
6. Expresia microARN-urilor din familia let-7: implicații în cancerul colorectal prin țintirea axei IGF1 și posibila asociere cu invazia perineurală	114
6.1. Introducere.....	114
6.2. Material și metodă	114
6.3. Rezultate	115
6.4. Discuții	128
7. Interrelații ale microARN-urilor din familia let-7 și genele implicate în apoptoză și calea de semnalizare NF-κB	132
7.1. Introducere.....	132
7.2. Material și metodă	132
7.3. Rezultate	133
7.4. Discuții	145
8. Concluzii și contribuții personale	148
9. Bibliografie.....	157
Anexe.....	174

I. PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul colorectal reprezintă unul dintre cancerelor cu cele mai mari rate de morbiditate și mortalitate în rândul pacienților cu cancer, reprezentând astfel o problemă majoră de sănătate în întreaga lume.

În anul 2020, la nivel mondial, cancerul colorectal s-a situat pe al treilea loc din punct de vedere al incidenței, iar în rândul populației din România este al treilea cel mai frecvent tip de cancer la bărbați și al doilea cel mai frecvent tip de cancer la femei. Riscul de apariție al cancerului colorectal este influențat atât de factori de mediu, cât și de factori genetici.

În ciuda eforturilor semnificative de prevenție și diagnosticare precoce, precum și a progreselor efectuate în tratamentul chirurgical și oncologic (radioterapie și chimioterapie), prognosticul cancerului colorectal rămâne unul rezervat. Mai mult decât atât, cadrele medicale se confruntă frecvent cu recidive și metastaze după realizarea intervenției chirurgicale. Trebuie menționat și rolul important al programelor de screening, cu impact pozitiv asupra diagnosticului precoce al cancerului colorectal, care au luat amploare în multe țări, precum și în România.

În ultimele decade, comunitatea științifică s-a axat pe identificarea unor biomarkeri capabili de a detecta cancerul colorectal în stadii timpurii și de a stabili cu o precizie cât mai mare prognosticul, răspunsul la tratament, precum și riscul de recidivă și metastazare al acestuia. De asemenea, acești biomarkeri ar putea fi utilizați pentru identificarea unei susceptibilități crescute de apariție a cancerului colorectal. Mai mult decât atât, ar putea reprezenta și niște instrumente utile pentru terapia pacienților care nu răspund la tratamentul sistemic. Odată identificați acești pacienți, ei ar putea beneficia de un tratament precoce activ, de modificarea schemei terapeutice sau de elaborarea unui plan strategic pentru a preveni apariția de recidive și metastaze.

Îmbunătățirea tehnicilor de biologie moleculară, precum și studiile de epigenetică și transcriptomică au dus la o mai bună înțelegere a fiziopatologiei cancerului colorectal. În acest sens s-au identificat numeroase tipuri de ARN ca biomarkeri potențiali în cancerul colorectal. În plus față de performanța diagnostică sau prognostică a unui singur biomarker, o combinație de diferite molecule ar putea îmbunătăți specificitatea și sensibilitatea mijloacelor diagnostice, prognostice și predictive.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII

Noile descoperiri cu privire la componenta genetică a procesului de carcinogeneză colorectală și implicarea proceselor metabolice sau a proceselor celulare, precum apoptoza și inflamația, conferă o nouă viziune în abordarea acestei entități patologice complexe. Sunt vizate molecule cu rol de biomarkeri de predicție și prognostic, precum și identificarea de noi ținte terapeutice cu ajutorul cărora să se dezvolte noi terapii cu menirea de a crește speranța și calitatea vieții pacienților.

Luând în considerare aspectele menționate anterior, studiile din cadrul prezentei tezei de doctorat s-au adresat următoarelor argumente:

1. necesitatea unei mai bune înțelegeri a mecanismelor moleculare care stau la baza carcinogenezei colorectale, precum și dereglările diverselor căi metabolice pentru identificarea celor mai fideli factori de predicție și prognostic;

2. necesitatea identificării a noi ținte terapeutice, precum și stabilirea unor strategii terapeutice complementare pentru prevenirea instalării rezistenței la terapie.

Scopul studiilor a constat în investigarea unor mecanisme moleculare implicate în apariția și progresia cancerelor colorectale și identificarea unor noi biomarkeri predictivi și noi posibile ținte terapeutice.

Obiectivele specifice ale studiilor au fost următoarele:

1. evaluarea expresiei genelor implicate în transportul acizilor grași și a expresiei microARN-urilor care țintesc aceste gene;

2. evaluarea expresiei microARN-urilor care aparțin familiei let-7 și implicarea lor în reglarea genelor din calea de semnalizare IGF1;

3. evaluarea expresiei genelor implicate în apoptoză și a interacțiunilor cu microARN-urile din familia let-7.

Conceptul de patologie moleculară suferă modificări dinamice odată cu trecerea timpului, astfel încât este necesară înțelegerea mecanismelor fine implicate în apariția,

progresia și diseminarea cancerului colorectal, precum și dezvoltarea unor terapii țintite în concordanță cu noile descoperiri. Se impune alinierea cercetării românești în domeniul patologiei moleculare cu cea internațională și elaborarea de noi perspective de cercetare pentru întreaga comunitate științifică.

4. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

În vederea îndeplinirii obiectivelor propuse activitățile au fost orientate în patru direcții:

Evaluarea lotului de pacienți cu CCR (N=39)

- evaluare histopatologică
- evaluare imunohistochimică
- status mutațional KRAS, BRAF
- status MSI

Studiul 1: molecule implicate în transportul acizilor grași în CCR

Evaluarea expresiei genelor implicate în transportul acizilor grași (39 pacienți cu CCR și lot control cu 18 pacienți) și a expresiei micro-ARN-urilor care țintesc aceste gene (25 pacienți cu CCR și lot control cu 18 pacienți)

Studiul 2: calea IGF1 și familia miR let-7 în CCR

Evaluarea expresiei microARN-urilor din familia let-7 și implicarea lor în reglarea genelor din calea de semnalizare IGF1 (25 pacienți cu CCR)

Studiul 3: apoptoza și familia miR let-7 în CCR

Evaluarea expresiei genelor implicate în apoptoză și a interacțiunilor cu micro-ARN-urile din familia let-7 (18 pacienți cu CCR și lot control cu 18 pacienți)

Figura 1. Schema planului de lucru

Selecția pacienților s-a realizat pe baza diagnosticului histopatologic de adenocarcinom colorectal. Pentru fiecare pacient s-au înregistrat următoarele caracteristici: parametri socio-demografici precum vârstă, sex; factori de risc precum consumul de tutun sau de alcool; prezența comorbidităților; localizarea tumorii; stadializarea TNM (tumoră, ganglioni limfatici, metastaze) și parametrii biochimici precum hemoglobină, leucocite, plachete, INR, fibrinogen, albumină, colesterol, trigliceride, ALT, AST, uree, creatinină, acid, uric, CEA, CA-19-9 și AFP.

Lotul control a fost reprezentat de persoane care au efectuat screening pentru cancer colorectal prin colonoscopie de la care s-a recoltat prin biopsie mucoasă colonică. Pentru fiecare individ s-au înregistrat parametri socio-demografici precum vârstă sau sex.

Criteriile de excludere pentru lotul control au fost următoarele:

1. prezența cancerului colorectal și/sau a bolilor inflamatorii intestinale,
2. terapia cu medicamente antiinflamatoare nesteroidiene în ultimele 3 luni și
3. terapia cu medicamente anticoagulante sau antiplachetare în ultimele 3 luni.

Evaluarea lotului de studiu a permis caracterizarea histopatologică, imunohistochimică, a statusului mutațional și MSI a țesuturilor tumorale incluse în studiu. Lotul de studiu a fost reprezentat de 39 pacienți diagnosticați cu adenocarcinom colorectal. Pentru fiecare tumoră am verificat gradul de invazie tumorală, prezența invaziei perineurale și limfovaskulare. Cu ajutorul testelor imunohistochimice am verificat prezența instabilității microsatelitare (MSI) prin testarea expresiei proteinelor implicate în procesul de reparare a erorilor de replicare a ADN-ului (MMR). Aceste proteine sunt reprezentate în principal de: MLH1, MSH2, MSH6 și PMS2. Statusul MSI a fost determinat și prin biologie moleculară și s-au comparat rezultatele obținute prin cele două metode în vederea identificării performanței și a raportului calitate/preț pentru cele două metode. Statusul mutațional al genei KRAS s-a determinat prin PCR-RFLP pentru detecția mutațiilor la nivelul codonilor 12 și 13, iar cel al genei BRAF prin PCR - hibridizare inversă pentru codonii 600 și 601.

Prezenta lucrare a îmbinat mai multe abordări, datele clinice ale pacienților fiind integrate și corelate cu datele histopatologice, imunohistochimice și de biologie moleculară. În plus, abordarea biostatistică a permis integrarea rezultatelor obținute cu informațiile existente în baze de date publice folosind analiza bioinformatică. Mai specific, s-au folosit:

↳ *tehnici histopatologice* pentru evaluarea inițială a tumorilor colorectale, precum și confirmarea țesuturilor normale,

↳ *tehnici imunohistochimice* pentru evaluarea expresiei proteice a CD36 și a statusului instabilității microsatelitare (MSI),

↳ *tehnici de biologie moleculară* pentru detecția mutațiilor KRAS, BRAF, al statusului instabilității microsatelitare, precum și a evaluării expresiei genice și a microARN-urilor în țesuturile incluse în fiecare studiu în parte,

↳ *programe dedicate de analiză biostatistică* pentru identificarea diferențelor semnificative în studiile de tip caz-control și a corelațiilor între toate rezultatele obținute,

↳ *tehnici de bioinformatică* pentru integrarea rezultatelor obținute cu rezultate din literatura de specialitate și pentru identificarea interacțiunilor de tipul microARN – ARNm.

5. EVALUAREA EXPRESIEI GENELOR IMPLICATE ÎN TRANSPORTUL ACIZILOR GRAȘI ȘI A MICROARN-URILOR CARE ȚINTESC ACESTE GENE

În primul studiu s-a evaluat expresia genelor implicate în transportul acizilor grași și a expresiei microARN-urilor care țintesc aceste gene.

S-a identificat expresia genelor care codifică pentru moleculele CD36, FASN, GPC4, SLC27A3, SLC27A4 și BIRC5. Pe baza analizei bioinformatică am selectat un panel de microARN-uri implicate în reglarea expresiei genelor analizate: miR-155-5p, miR-16-5p, miR-27a-3p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-107 și miR-195-5p. Nivelul de exprimare a genelor și a microARN-urilor în țesutul tumoral a fost analizat pentru întregul lot de pacienți (39 pacienți), respectiv un sublot de pacienți (25 pacienți) comparativ cu țesutul peritumoral pereche sau cu mucoasa colonică normală recoltată de la indivizi sănătoși (18 indivizi). De asemenea am realizat analiza statistică pentru identificarea corelațiilor dintre nivelul de expresie, parametrii clinici, caracteristicile histopatologice, imunohistochimice, statusul MSI și statusul mutațional al tumorilor.

Rezultate

Din totalul de 39 de pacienți cu diagnostic histopatologic de adenocarcinom colorectal, 18 (46,15%) au fost de sex masculin și 21 (53,85%) au fost de sex feminin.

Din totalul de 18 indivizi sănătoși, 8 (44,44%) au fost de sex masculin și 10 (55,56%) au fost de sex feminin.

Referitor la localizarea tumorii 61,54% din pacienți (24 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de colon, 23,08% din pacienți (9 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de joncțiune recto-sigmoidiană și 15,38% din pacienți (6 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de rect.

În ceea ce privește stadializarea TNM a tumorilor studiate: 15,38% din tumori (6 tumori) au avut stadiul T2, 71,79% din tumori (28 tumori) au avut stadiul T3 și 12,82% din tumori (5 tumori) au avut stadiul T4 (2 stadiul T4A și 3 stadiul T4B).

Gradul de invazie a tumorii pentru pacienții studiați a fost: G1 pentru 15,38% din tumori (6 tumori), G2 pentru 66,67% din tumori (26 tumori) și G3 pentru 17,95% din tumori (7 tumori).

Invazia limfovaculară a fost prezentă la 10 pacienți (25,64% din pacienții înrolați în studiu), în timp ce invazia limfovaculară a fost absentă la 19 pacienți (74,36% din pacienți).

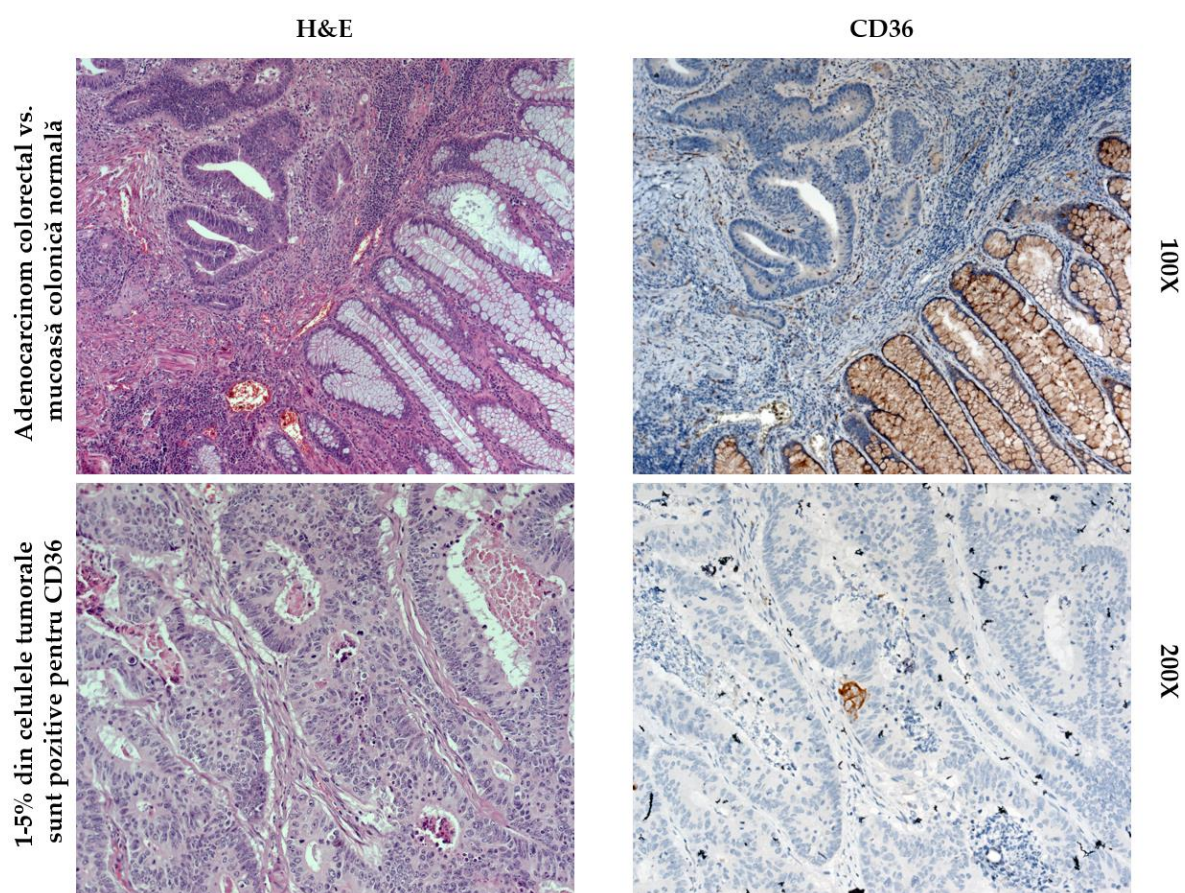
Invazia perineurală a fost prezentă la 6 pacienți (15,38% din pacienții înrolați în studiu), în timp ce invazia perineurală a fost absentă la 33 pacienți (84,62% din pacienți).

Prin metoda IHC s-au identificat 4 cazuri (10,25%) negative pentru cel puțin doi markeri studiați (MSI-H). Rezultatele obținute pentru cei 4 pacienți cu MSI identificate prin IHC s-au suprapus rezultatelor obținute prin PCR.

Mutațiile identificate prin PCR-RFLP la nivelul codonilor 12 și 13 au fost prezente la 17 pacienți din lotul pacienților diagnosticați cu adenocarcinom colorectal (43,59% din pacienți).

În ceea ce privește mutațiile la nivelul genei *BRAF*, patru cazuri (10,26% din tumori) au prezentat mutație V600E, identificată prin tehnica PCR-hibridizare inversă.

În cadrul lotului de pacienți cu diagnostic histopatologic de adenocarcinom colorectal a fost evaluată expresia imunohistochimică a CD36 pentru toate cele 39 de perechi de țesut tumoral – țesut peritumoral.



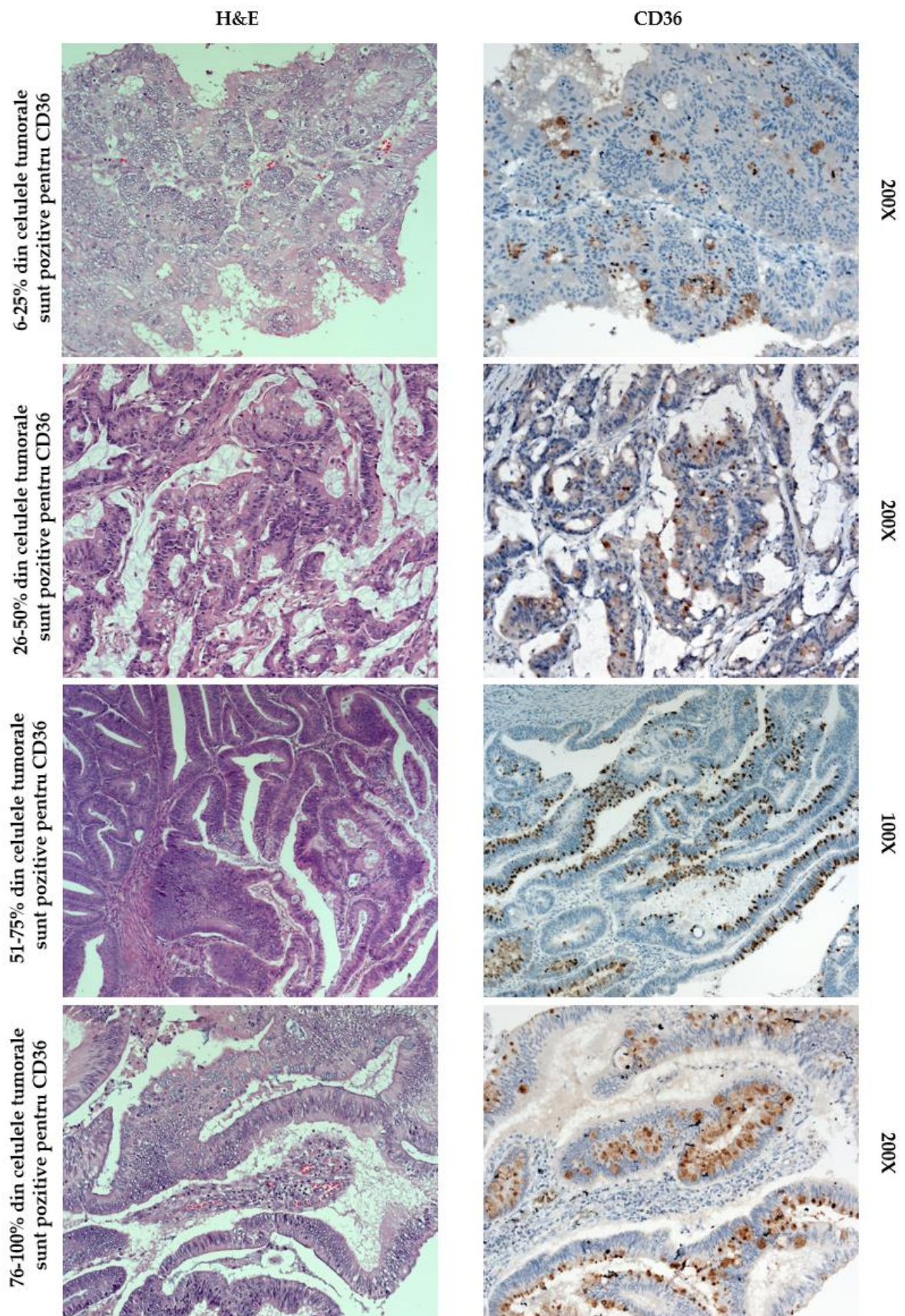


Figura 2. Expresia imunohistochimică diferențiată a CD36 în țesuturile tumorale și peritumorale

Analiza expresiei genice relative țesut tumoral versus țesut peritumoral, țesut tumoral versus mucoasă colonică normală, țesut peritumoral versus mucoasă colonică normală este prezentată în figura 3.

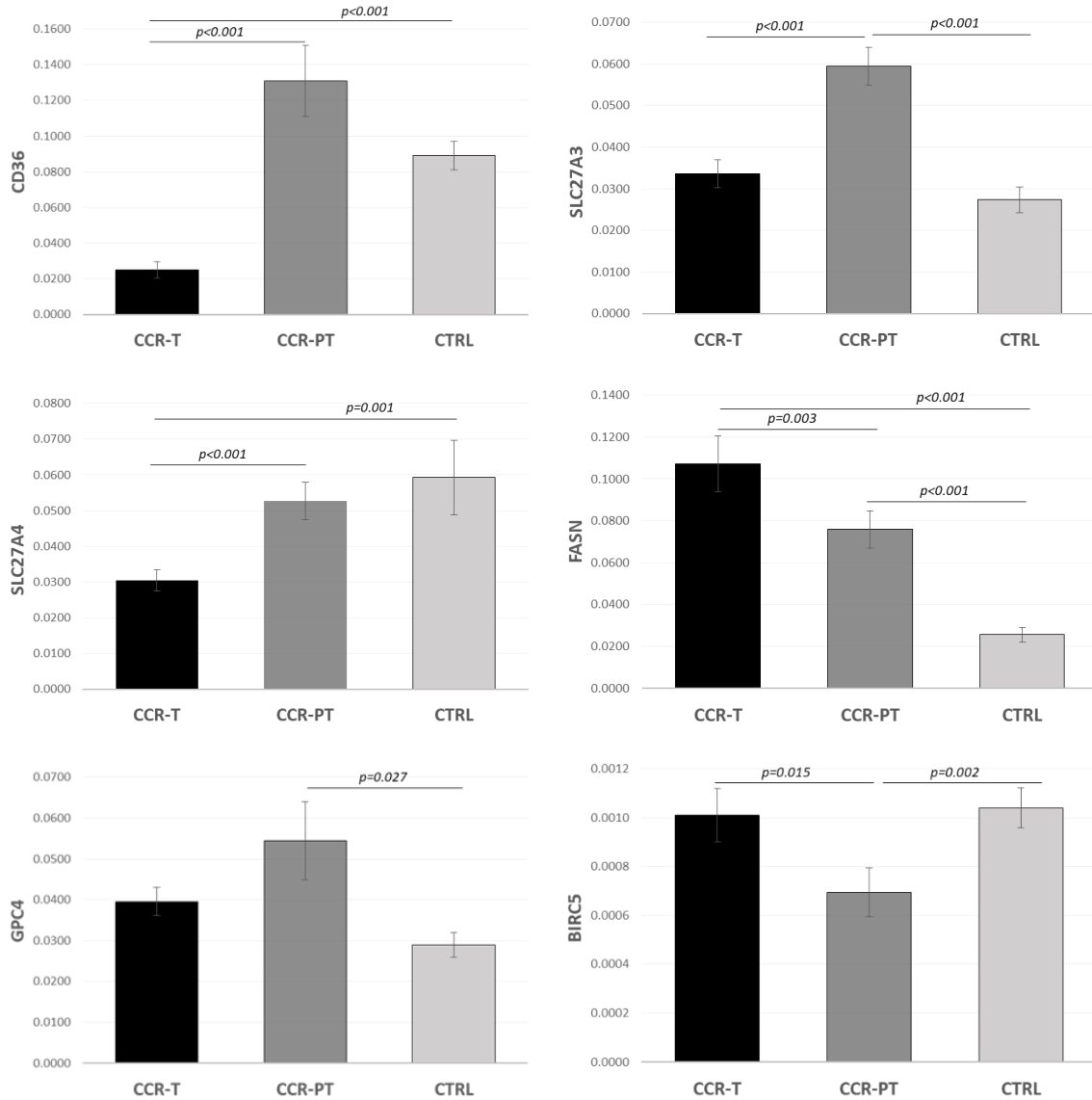


Figura 3. Expresia CD36, SLC27A3, SLC27A4, FASN, GPC4 și BIRC5 în țesuturile tumorale, peritumorale și normale. Nivelurile de exprimare sunt prezentate ca valori medii ale $2^{-\Delta CT} \pm$ eroarea medie standard (SEM).

Analiza in silico pentru identificarea interacțiunilor dintre microARN-uri și ARN-urile mesagere de interes a condus la șapte microARN-uri candidate care, ulterior, au fost validate cu ajutorul datelor identificate în literatura de specialitate. Pe baza acestei selecții,

a fost analizată expresia următoarelor microARN-uri: miR-155-5p, miR-16-5p, miR-27a-3p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-107 și miR-195-5p.

Prin tehnici de biologie moleculară, am identificat o afectare semnificativă a acestor microARN-uri în cohorta de pacienți analizată, după cum urmează: subexprimarea miR-16-5p, miR-26b-5p, miR-107 și miR-195-5p în țesuturile tumorale comparativ cu țesuturile peritumorale și subexprimarea miR-195-5p și supraexprimarea miR-27a-3p în țesuturile tumorale comparativ cu țesuturile normale.

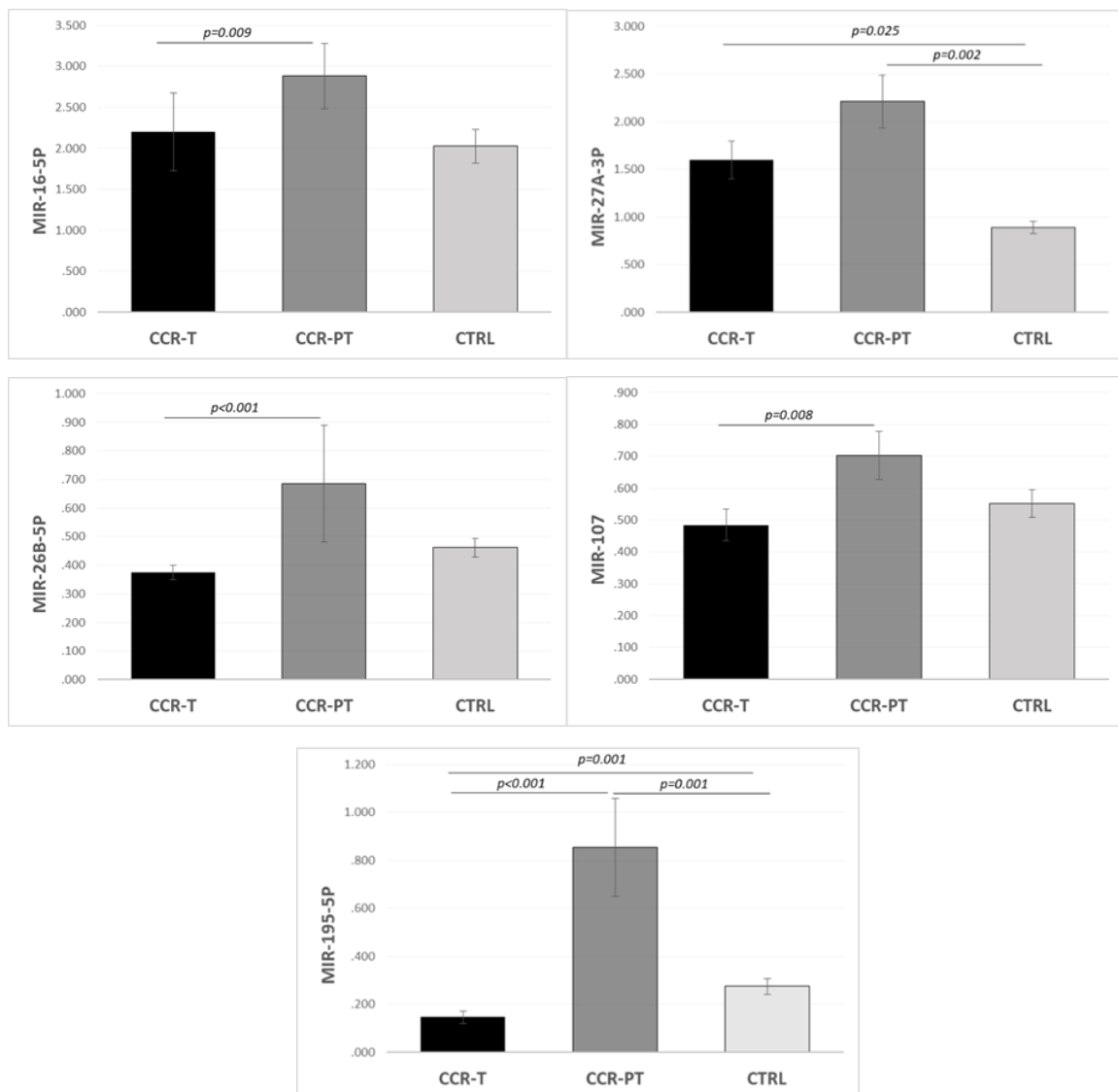


Figura 4. Expresia miR-16-5p, miR-27a-3p, miR-26b-5p, miR-107 și miR-195-5p în țesuturile tumorale, peritumorale și normale. Nivelurile de exprimare sunt prezentate ca valori medii ale $2^{-\Delta Ct} \pm$ eroarea medie standard (SEM).

Când am comparat nivelurile microARN-urilor din țesuturile tumorale de la 11 pacienți cu prezență de metastaze limfoganglionare (LNI+) versus pacienți fără afectare ganglionară, am constatat că miR-27a-3p a fost supraexprimat (FR = 1,84; p = 0,018). De asemenea, la cei 11 pacienți cu afectare a ganglionilor loco-regionali am identificat o corelație liniară negativă între expresia miR-27a-3p și CD36 (p = 0,011, r = -0,730) și o corelație pozitivă între miR-195-5p și FASN (p = 0,023, r = 0,673).

Comparând țesuturile tumorale de la cei 6 pacienți cu invazie perineurală cu cei 19 pacienți fără invazie am identificat supraexpresia miR-27a-3p (FR = 1,75; p = 0,014). Nu am identificat alte diferențe în ceea ce privește expresia microARN-urilor și a ARN-urilor mesagere în funcție de invazia perineurală.

6. EXPRESIA MICROARN-URILOR DIN FAMILIA LET-7: IMPLICAȚII ÎN CANCERUL COLORECTAL PRIN ȚINTIREA AXEI IGF1 ȘI POSIBILA ASOCIERE CU INVAZIA PERINEURALĂ

În cadrul acestui studiu am identificat expresia microARN-urilor din familia let-7 ca principali reglatori ai genelor care codifică receptorii și substraturile implicate în calea de semnalizare IGF1. S-a studiat expresia pentru următoarele microARN-uri: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7g-5p și hsa-let-7i-5p.

Studiul și-a propus identificarea nivelului de exprimare a microARN-urilor în țesutul tumoral comparativ cu țesutul peritumoral pereche. De asemenea am realizat analiza statistică pentru identificarea corelațiilor dintre nivelul de expresie al microARN-urilor, parametrii clinici și caracteristicile histopatologice, imunohistochimice, statusul MSI și mutațional al tumorilor. Analiza s-a realizat pe un lot de 25 de pacienți cu cancer colorectal primar.

Rezultate

Din totalul de 25 de pacienți cu diagnostic histopatologic de adenocarcinom colorectal, 12 (46,15%) au fost de sex masculin și 13 (53,85%) au fost de sex feminin.

Referitor la localizarea tumorii 61,54% din pacienți (24 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de colon, 23,08% din pacienți (9 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de joncțiune recto-sigmoidiană și 15,38% din pacienți (6 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de rect. În ceea ce privește stadializarea TNM a tumorilor studiate: 12,00% din tumori (3 tumori) au fost depistate în stadiul T2, 72,00% din tumori (18 tumori) au fost depistate în stadiul T3 și 16,00% din tumori (4 tumori) au fost depistate în stadiul T4.

Invasia limfoganglionilor loco-regionali a fost absentă în 13 cazuri (52% din pacienți) și prezentă în 12 cazuri (48% din pacienți), 7 pacienți fiind în stadiul N1 și 5 pacienți în stadiul N2. Gradul de diferențiere a tumorii pentru pacienții studiați a fost: G1 pentru 16,00% din tumori (4 tumori), G2 pentru 56,00% din tumori (14 tumori) și G3 pentru 28,00% din tumori (7 tumori).

Invasia limfovasculară a fost prezentă la 9 pacienți (36,00% din pacienții înrolați în studiu), în timp ce invazia limfovasculară a fost absentă la 16 pacienți (64,00% din

pacienți). Invazia perineurală a fost prezentă la 6 pacienți (24,00% din pacienții înrolați în studiu), în timp ce invazia perineurală a fost absentă la 19 pacienți (76,00% din pacienți).

Instabilitatea microsatelitară a fost prezentă la 2 pacienți (8,00% din pacienții înrolați în studiu). Rezultatele obținute pentru cei 2 pacienți cu MSI identificate prin IHC s-au suprapus rezultatelor obținute prin PCR.

Mutațiile identificate prin PCR-RFLP la nivelul codonilor 12 și 13 au fost prezente la 12 pacienți din lotul pacienților diagnosticați cu adenocarcinom colorectal (48,00% din pacienți). În ceea ce privește mutațiile la nivelul genei BRAF, două cazuri (8,00% din tumori) au prezentat mutație V600E.

Analiza *in silico* pentru a evalua interacțiunea microARN – gene țintă dintre cele opt microARN-uri care aparțin familiei let-7 și genele implicate în calea de semnalizare IGF1 a arătat că toate cele opt microARN-uri au fost prezise computațional sau validate experimental ca reglatori ai genelor selectate, cu excepția IGF2R și IRS1.

Studiul expresiei relative a microARN-urilor dintre țesutul tumoral (T) și mucoasa peritumorală pereche (PT) a arătat că șapte din cele opt microARN-uri analizate au fost subexprimate în mod semnificativ statistic în țesutul tumoral: let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p și let-7g-5p. Let-7i-5p a fost moderat subexprimat în țesutul tumoral, însă fără a atinge semnificația statistică.

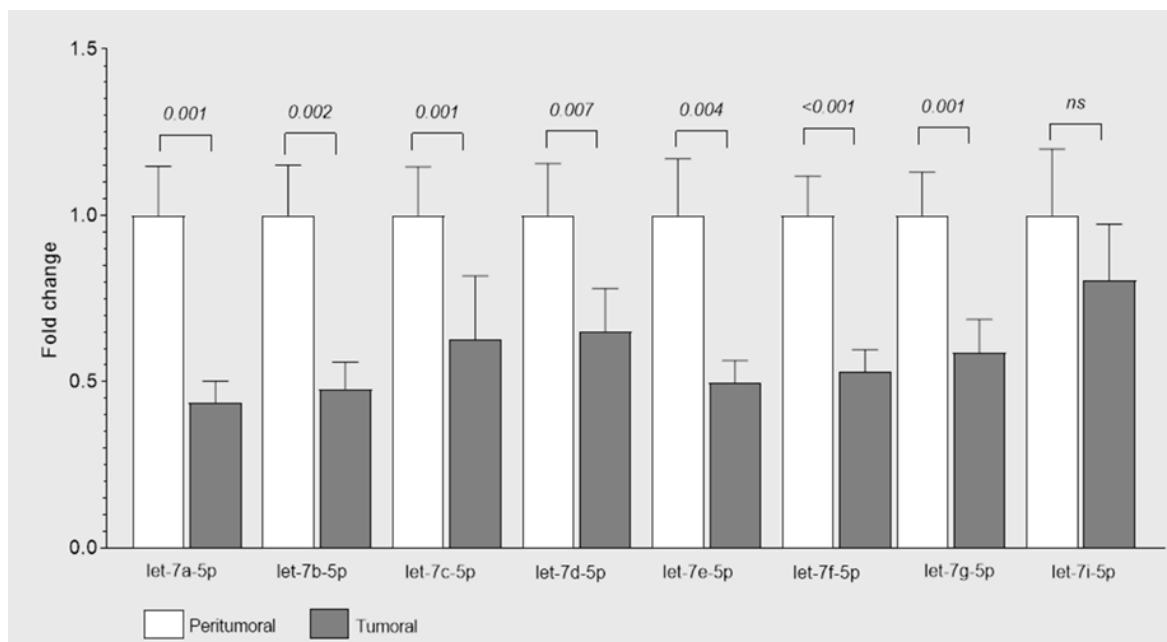


Figura 5. Nivelurile de expresie ale microARN-urilor din familia let-7 în țesuturile T și PT de la 25 de pacienți cu CCR. Barele reprezintă media expresiei ± SEM. Semnificația statistică a fost calculată cu testul Wilcoxon; ns = nesemnificativ.

Comparând țesuturile tumorale cu invazie perineurală (IPN+) cu cele fără invazie perineurală (IPN-), am identificat o supraexpresie în probele (IPN +) ale următoarelor microARN-uri: let-7a-5p (FC=2,30, p=0,014), let-7b-5p (FC=2,87, p=0,006), let-7c-5p (FC=3,65, p=0,011), let-7d-5p (FC=2,71, p=0,009) și let-7i- 5p (FC=2,63, p=0,036).

Studiul comparativ al microARN-urilor din familia let-7 în funcție de statusul mutațional al genelor KRAS și BRAF au relevat modificări de expresie în țesuturile tumorale cu mutații. Astfel în cele 12 țesuturi tumorale cu mutații KRAS (codonul 12 sau codonul 13) am constatat că miR-let-7e-5p a fost supraexprimat (FC=1,78, p=0,040) comparativ cu cele 13 țesuturi tumorale fără mutații KRAS. Această creștere a fost observată și comparând țesuturile peritumorale ale celor două grupuri (FC=2,15; p=0,004) chiar dacă niciunul dintre țesuturile PT nu a prezentat mutații.

7. INTERRELAȚII ALE MICROARN-URILOR DIN FAMILIA LET-7 ȘI GENELE IMPLICATE ÎN APOPTOZĂ ȘI CALEA DE SEMNALIZARE NF-KB

În cadrul acestui studiu am examinat expresia a opt gene țintă ale microARN-urilor din familia let-7 implicate în apoptoză și în calea de semnalizare NF-κB. Genele au fost identificate ca țintă prin analiza cu miRWalk și au fost reprezentate de: BCL2A1, BCL2L1, CASP8, CFLAR, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A și TRAF2.

Studiul și-a propus identificarea nivelului de exprimare a genelor selectate în țesutul tumoral comparativ cu mucoasa colonică normală. De asemenea, am realizat analiza statistică pentru identificarea corelațiilor dintre nivelul de expresie genică și localizarea și caracteristicile histopatologice ale tumorilor.

Rezultate

Din totalul de 18 de pacienți cu diagnostic histopatologic de adenocarcinom colorectal, 10 (55,56%) au fost de sex masculin și 8 (44,44%) au fost de sex feminin.

Din totalul de 18 indivizi sănătoși, 8 (44,44%) au fost de sex masculin și 10 (55,56%) au fost de sex feminin.

Referitor la localizarea tumorii: 66,67% din pacienți (12 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de colon, 27,78% din pacienți (5 pacienți) s-au prezentat cu adenocarcinom de joncțiune recto-sigmoidiană și 5,56% din pacienți (1 pacient) s-au prezentat cu adenocarcinom de rect.

În ceea ce privește stadializarea TNM a tumorilor studiate 5,56% din tumori (1 tumoră) au avut stadiul T2, 77,78% din tumori (14 tumori) au avut stadiul T3 și 16,67% din tumori (3 tumori) au avut stadiul T4.

Gradul de diferențiere a tumorii pentru pacienții studiați a fost: G1 pentru 11,11% din tumori (2 tumori), G2 pentru 66,67% din tumori (12 tumori) și G3 pentru 22,22% din tumori (4 tumori).

Studiul expresiei genice relative dintre țesutul tumoral (T) și mucoasa colonică normală (CTRL) a evidențiat supraexpresia semnificativă statistic în țesutul tumoral a tuturor genelor studiate.

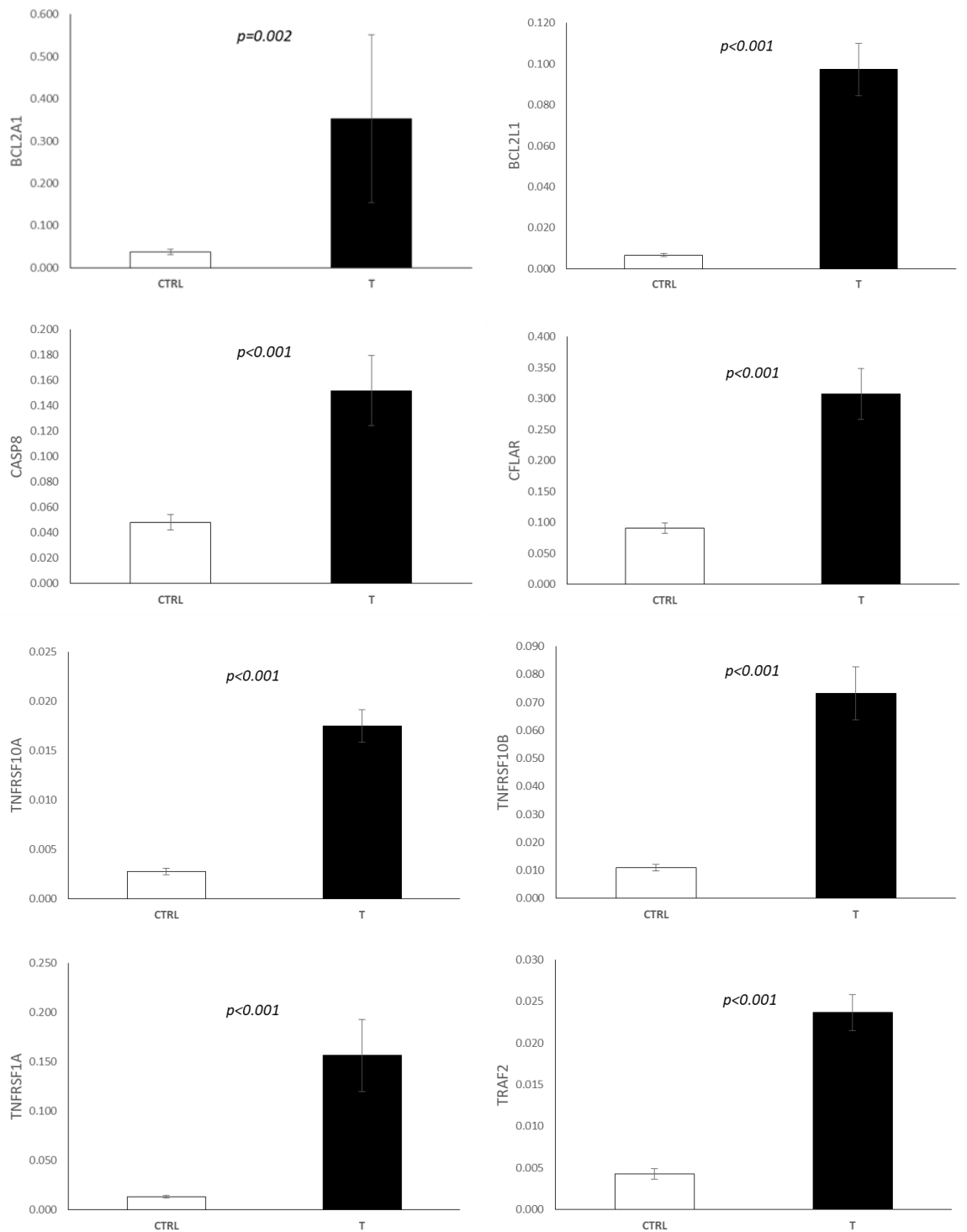


Figura 6. Nivelul de expresie a BCL2A1, BCL2L1, CASP8, CFLAR, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A și TRAF2 în țesuturile tumorale de la 18 de pacienți cu cancer colorectal (CCR) și în mucoasa colonică normală de la 18 indivizi sănătoși (CTRL). Barele reprezintă media expresiei \pm SEM. Semnificația statistică a fost calculată cu testul Mann Whitney

Analizând nivelurile de expresie genică în funcție de gradul de invazie al tumorilor am constatat o subexpresie a genelor BCL2L1 și CASP8 în tumorile slab diferențiate (G3) comparativ cu cele moderat diferențiate (G2). Tumorile bine diferențiate (G1) nu au prezentat nivel de expresie diferit cu semnificație statistică.

8. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Obiectivul principal al prezentei teze de doctorat a fost identificarea unor mecanisme moleculare ale carcinogenezei colorectale și a unor noi biomarkeri prognostici și predictivi pentru terapia țintită în cancerul colorectal.

Mai specific, studiile au vizat trei direcții de cercetare: transportul acizilor grași, calea de semnalizare IGF1 și apoptoza.

Pentru fiecare direcție de cercetare, rezultatele obținute au validat rezultatele existente în literatura de specialitate și au evidențiat elemente de noutate ale profilului molecular al pacienților cu cancer colorectal din România.

1. Evaluarea expresiei genelor implicate în transportul acizilor grași și a expresiei microARN-urilor care țintesc aceste gene

În acest studiu am identificat o afectare generală a expresiei genelor cheie implicate în metabolismul acizilor grași și un set de microARN-uri care țintesc aceste gene în mucoasa colorectală a pacienților cu adenocarcinom colorectal comparativ cu mucoasa adiacentă non-tumorală și mucoasa colonică normală.

Nivelul de expresie al genelor CD36, FASN, GPC4, BIRC5, SLC27A3 și SLC27A4 a fost analizat comparativ în probe pereche recoltate de la 39 pacienți cu cancer colorectal (țesut tumoral și țesut peritumoral) și 18 țesuturi normale recoltate de la nivelul mucoasei colonice a unor indivizi fără diagnostic de adenocarcinom colorectal.

Șapte microARN-uri care țintesc gena CD36 și majoritatea genelor analizate au fost evaluate în 25 de pacienți și în toate controalele analizate.

O afectare semnificativă a expresiei tuturor genelor analizate, cu excepția GPC4, a fost identificată în țesuturile tumorale comparativ cu cele peritumorale. Mai specific, am identificat subexpresia CD36, SLC27A3 și SLC27A4 și supraexpresia FASN și BIRC5. Comparând expresia genică între țesuturile tumorale și control, doar CD36 și SLC27A4 au fost subexprimate în țesutul tumoral, în timp ce FASN a fost supraexprimat. Nu au fost observate modificări ale nivelurilor de CD36 și SLC27A4 în țesuturile peritumorale în comparație cu țesutul normal, în timp ce SLC27A3, FASN și GPC4 au fost supraexprimate, iar BIRC5 a fost subexprimat.

Analiza in silico a identificat șapte microARN-uri care țintesc CD36: miR-155-5p, miR-16-5p, miR-27a-3p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-107 și miR-195-5p.

Comparând expresia acestor microARN-uri între țesuturile tumorale și cele peritumorale am identificat subexpresia miR-16-5p, miR-26b-5p, miR-107 și miR-195-5p. Comparând expresia microARN-urilor între țesuturile tumorale și cele normale am identificat subexpresia miR-195-5p și supraexpresia miR-27a-3p. Ambele microARN-uri au fost supraexprimate în țesutul peritumoral comparativ cu țesutul normal.

Analiza corelațiilor Pearson dintre nivelul de exprimare a genelor și microARN-urilor analizate și parametrii socio-demografici, clinici și paraclinici, precum și caracteristicile morfofuncționale ale țesuturilor tumorale a relevat următoarele:

↳ miR-27a-3p a fost supraexprimat în țesuturile tumorale de la 11 pacienți cu prezență de metastaze la nivelul limfoganglionilor; la aceiași pacienți am identificat o corelație liniară negativă între expresia miR-27a-3p și CD36 și o corelație liniară pozitivă între miR-195-5p și FASN;

↳ miR-27a-3p a fost supraexprimat în țesuturile tumorale de la 6 pacienți cu invazie perineurală

Nu am observat modificări semnificative ale nivelului de expresie a genelor și microARN-urilor în funcție de localizarea tumorii, stadiul TNM sau gradul de invazie al tumorii.

Nu au existat corelații între valorile parametrilor hematologici, biochimici, markerilor tumorali și nivelul de expresie al genelor studiate.

Statusul mutațional al genelor KRAS, BRAF și statusul MSI nu au influențat semnificativ nivelul de exprimare genică și a microARN-urilor.

2. Expresia microARN-urilor din familia let-7: implicații în cancerul colorectal prin țintirea axei IGF1 și posibila asociere cu invazia perineurală

Am identificat o afectare generală a expresiei microARN-urilor din familia let7 în mucoasa colorectală recoltată de la 25 pacienți cu cancer colorectal comparativ cu mucoasa adiacentă non-tumorală. Astfel, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p și let-7g-5p au fost subexprimate semnificativ statistic, iar let-7i-5p a fost moderat subexprimat în țesutul tumoral, însă fără a atinge semnificația statistică.

În țesuturile tumorale cu invazie perineurală let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p și let-7i-5p au fost supraexprimate comparativ cu țesuturile tumorale fără invazie perineurală.

În țesuturile tumorale cu mutații KRAS (codonul 12 sau codonul 13) am constatat că miR-let-7e-5p a fost supraexprimat. Această creștere a fost observată și comparând

țesuturile peritumorale ale celor două grupuri, deși țesuturile peritumorale nu au prezentat mutații.

Nu au fost observate diferențe semnificative ale nivelului de expresie a microARN-urilor analizate în funcție de caracteristicile tumorilor (localizare, grad de diferențiere tumorală, invazie limfovasculară, instabilitate a microsateliților) sau ale pacienților (vârstă, sex, consum moderat de alcool și antecedente heredocolaterale pentru cancer).

3. Interrelații ale microARN-urilor din familia let-7 și genele implicate în apoptoză și calea de semnalizare NF-κB

Prin intermediul analizei bioinformatică, am identificat interacțiunile dintre microARN-urile din familia let7 și genele implicate în procesul de apoptoză și în calea de semnalizare NF-κB: BCL2A1, BCL2L1, CASP8, CFLAR, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A și TRAF2.

Analiza expresiei genice pe un lot de 18 pacienți cu cancer colorectal și 18 controale a relevat supraexpresia celor opt gene studiate.

Genele BCL2L1 și CASP8 au fost supraexprimate în țesuturile tumorale moderat diferențiate (G2) comparativ cu țesuturile tumorale slab diferențiate (G3).

Nu am identificat diferențe atunci când am stratificat pacienții în funcție de sex, vârstă, prezența comorbidităților, localizarea tumorii sau stadiul TNM.

Ca o *limitare* a acestor studii, am putea menționa numărul scăzut de pacienți înrolați în studiile din prezenta teză de doctorat și lipsa evidențierii experimentale a interacțiunilor microARN – gene țintă.

Ca o *directivă de cercetare* pentru studiile viitoare ne propunem aprofundarea acestora în cohorte mai mari de pacienți și controale, precum și validarea interacțiunilor în diferite linii celulare tumorale colorectale.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Al-Sukhni, E. *et al.* (2017) 'Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: A retrospective cohort study.', *International journal of surgery (London, England)*, 37, pp. 42–49.
2. Aran, V. *et al.* (2016) 'Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality.', *Clinical colorectal cancer*, 15(3), pp. 195–203.
3. Bahnassy, A.A. *et al.* (2018) 'MiRNAs as molecular biomarkers in stage II egyptian colorectal cancer patients.', *Experimental and molecular pathology*, 105(3), pp. 260–271.
4. Bardou, M. *et al.* (2022) 'Review article: obesity and colorectal cancer.', *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 56(3), pp. 407–418.
5. Barisciano, G. *et al.* (2020) 'miR-27a is a master regulator of metabolic reprogramming and chemoresistance in colorectal cancer', *British Journal of Cancer*, 122(9), pp. 1354–1366.
6. Battaglin, F. *et al.* (2018) 'Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives.', *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 16(11), pp. 735–745.
7. Carvalho, B. *et al.* (2012) 'Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism.', *Cellular oncology (Dordrecht)*, 35(1), pp. 53–63.
8. Chen, Y.-J. *et al.* (2021) 'Prognostic and immunological role of CD36: A pan-cancer analysis.', *Journal of Cancer*, 12(16), pp. 4762–4773.
9. Cojocneanu, R. *et al.* (2020) 'Plasma and Tissue Specific miRNA Expression Pattern and Functional Analysis Associated to Colorectal Cancer Patients', *Cancers*, 12(4), p. 843.
10. Coleman, O., Ecker, M. and Haller, D. (2022) 'Dysregulated lipid metabolism in colorectal cancer.', *Current opinion in gastroenterology*, 38(2), pp. 162–167.
11. **Dobre, M. *et al.* (2022) 'Molecular profile of the NF-κB signalling pathway in human colorectal cancer', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(24), pp. 5966–5975.**
12. Drury, J. *et al.* (2020) 'Inhibition of Fatty Acid Synthase Upregulates Expression of CD36 to Sustain Proliferation of Colorectal Cancer Cells.', *Frontiers in oncology*, 10, p. 1185.

13. Drury, J., Rychahou, P.G., *et al.* (2022) 'Upregulation of CD36, a Fatty Acid Translocase, Promotes Colorectal Cancer Metastasis by Increasing MMP28 and Decreasing E-Cadherin Expression.', *Cancers*, 14(1).
14. Fang, Y. *et al.* (2019) 'CD36 inhibits β -catenin/c-myc-mediated glycolysis through ubiquitination of GPC4 to repress colorectal tumorigenesis.', *Nature communications*, 10(1), p. 3981.
15. Fleming, M. *et al.* (2012) 'Colorectal carcinoma: Pathologic aspects.', *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), pp. 153–73.
16. Gong, J. *et al.* (2020) 'Reprogramming of lipid metabolism in cancer-associated fibroblasts potentiates migration of colorectal cancer cells.', *Cell death & disease*, 11(4), p. 267.
17. Guerrero-Rodríguez, S.L. *et al.* (2022) 'Role of CD36 in cancer progression, stemness, and targeting.', *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, p. 1079076.
18. Hassanzadeh, P. (2011) 'Colorectal cancer and NF- κ B signaling pathway.', *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 4(3), pp. 127–32.
19. Heckl, S.M. *et al.* (2020) 'Questioning the IGF1 receptor's assigned role in CRC - a case for rehabilitation?', *BMC cancer*, 20(1), p. 704.
20. Hoxha, M. and Zappacosta, B. (2022) 'A review on the role of fatty acids in colorectal cancer progression.', *Frontiers in pharmacology*, 13, p. 1032806.
21. Huang, Z. and Yang, M. (2022) 'Molecular Network of Colorectal Cancer and Current Therapeutic Options.', *Frontiers in oncology*, 12, p. 852927.
22. Jin, Y. *et al.* (2018) 'Overcoming stemness and chemoresistance in colorectal cancer through miR-195-5p-modulated inhibition of notch signaling', *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, pp. 445–453.
23. Kasprzak, A. (2021) 'Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Signaling in Glucose Metabolism in Colorectal Cancer.', *International journal of molecular sciences*, 22(12).
24. Krauß, D., Fari, O. and Sibilía, M. (2022) 'Lipid Metabolism Interplay in CRC-An Update.', *Metabolites*, 12(3).
25. Lee, I.H. *et al.* (2021) 'Predictive Value of Circulating miRNAs in Lymph Node Metastasis for Colon Cancer', *Genes*, 12(2), p. 176.
26. Liu, T.-P. *et al.* (2016) 'Down-regulation of let-7a-5p predicts lymph node metastasis and prognosis in colorectal cancer: Implications for chemotherapy.', *Surgical oncology*, 25(4), pp. 429–434.

27. Long, Z. *et al.* (2020) 'Metabolomic Markers of Colorectal Tumor With Different Clinicopathological Features', *Frontiers in Oncology*, 10.
28. Mazurek, S. and Eigenbrodt, E. (2003) 'The tumor metabolome.', *Anticancer research*, 23(2A), pp. 1149–54.
29. Menendez, J.A. and Lupu, R. (2007) 'Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis', *Nature Reviews Cancer*, 7(10), pp. 763–777.
30. Meng, M. *et al.* (2021) 'The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer.', *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 140, p. 111717.
31. Molendijk, J. *et al.* (2020) 'Lipid mechanisms in hallmarks of cancer.', *Molecular omics*, 16(1), pp. 6–18.
32. Morkel, M. *et al.* (2015) 'Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance.', *Oncotarget*, 6(25), pp. 20785–800.
- 33. Niculae, A.M., Dobre, M., Herlea, V., Manuc, T.E., *et al.* (2022) 'Let-7 microRNAs Are Possibly Associated with Perineural Invasion in Colorectal Cancer by Targeting IGF Axis', *Life*, 12(10), p. 1638.**
- 34. Niculae, A.M., Dobre, M., Herlea, V., Vasilescu, F., *et al.* (2022) 'Lipid Handling Protein Gene Expression in Colorectal Cancer: CD36 and Targeting miRNAs', *Life*, 12(12), p. 2127.**
35. Samaka Rehab M, A.-S.D.R.A.-Z.A.Y.D.M.M. (2021) 'Role of fatty acid synthase in colorectal carcinoma', *Menoufia Med J*, 34(3), pp. 1095–1100.
36. Saraste, A. (2000) 'Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis', *Cardiovascular Research*, 45(3), pp. 528–537.
37. Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) 'Cancer statistics, 2019', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), pp. 7–34.
38. Slattery, M.L. *et al.* (2018) 'The NF- κ B signalling pathway in colorectal cancer: associations between dysregulated gene and miRNA expression.', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 144(2), pp. 269–283.
39. Vigneri, P.G. *et al.* (2015) 'The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy.', *Frontiers in oncology*, 5, p. 230.
40. Yamagishi, H. *et al.* (2016) 'Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers.', *Chinese journal of cancer*, 35, p. 4.

41. Zaytseva, Y.Y. *et al.* (2015) 'Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration.', *Oncotarget*, 6(22), pp. 18891–904.

42. Zhou, X. *et al.* (2018) 'Identifying miRNA and gene modules of colon cancer associated with pathological stage by weighted gene co-expression network analysis', *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, pp. 2815–2830.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. **Niculae AM**, Dobre M, Herlea V, Vasilescu F, Ceafalan LC, Trandafir B, Milanesi E, Hinescu ME. Lipid Handling Protein Gene Expression in Colorectal Cancer: CD36 and Targeting miRNAs. *Life (Basel)*. 2022 Dec 16;12(12):2127. doi: 10.3390/life12122127.

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36556492/>

2. **Niculae AM**, Dobre M, Herlea V, Manuc TE, Trandafir B, Milanesi E, Hinescu ME. Let-7 microRNAs Are Possibly Associated with Perineural Invasion in Colorectal Cancer by Targeting IGF Axis. *Life (Basel)*. 2022 Oct 19;12(10):1638. doi: 10.3390/life12101638.

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36295073/>

3. Dobre M, Trandafir B, Milanesi E, Salvi A, Bucuroiu IA, Vasilescu C, **Niculae AM***, Herlea V*, Hinescu ME, Constantinescu G. Molecular profile of the NF- κ B signalling pathway in human colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2022 Dec;26(24):5966-5975. doi: 10.1111/jcmm.17545. Epub 2022 Nov 25. (* co-author correspondent)

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36433652/>