

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

Profilul expresiei microARN în adenocarcinoamele colorectale

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof Univ Dr Mariana Așchie

Student - Doctorand:

Costel Stelian Brînzan

CONSTANȚA - 2020

Cuprins

<i>Introducere</i>	6
--------------------------	---

PARTEA GENERALĂ

Stadiul actual al cunoașterii	8
--	---

PARTEA SPECIALĂ

Contribuția personală	11
------------------------------------	----

Ipoteze de cercetare	11
-----------------------------------	----

Obiectivele principale	11
------------------------------	----

Obiectivele secundare	12
-----------------------------	----

Metodologia cercetării	12
-------------------------------------	----

Selecția cazurilor	12
--------------------------	----

Metode de cercetare	13
---------------------------	----

Extracția și cuantificarea speciilor de miARN/ARNm	13
--	----

Revers-transcrierea și detecția speciilor de miARN/ARNm prin PCR în timp real ...	16
---	----

Normalizarea și cuantificarea datelor qPCR	14
--	----

Analiza statistică a datelor	15
------------------------------------	----

Rezultate	16
------------------------	----

Caracteristicile demografice și clinico-patologice ale lotului	16
--	----

Analiza imunohistochimică a proteinelor nucleare	16
--	----

Analiza expresia genelor miARN.....	17
-------------------------------------	----

Analiza expresiei genelor ARNm.....	20
-------------------------------------	----

Fezabilitatea diagnostică a speciilor de miARN	21
--	----

Corelarea expresiei genelor miARN/ARNm în raport cu variabilele clinicopatologice ..	24
--	----

Discuții	27
Concluzii finale	29
Bibliografie	30
Lista de publicații.....	33

Cuvinte cheie: Adenocarcinom colorectal, microARN-uri, stadializarea TNM, biomarkeri

Introducere

Cancerul colorectal reprezintă o boală multifactorială/poligenică, rezultatul acumulării succesive de anomalii genetice și epigenetice, dezechilibre ce activează secvențial oncogenele sau inactivează genele supresoare tumoral.

Din momentul diagnosticului și până la obținerea unui răspuns clinic complet, examenul histopatologic joacă un rol central în îngrijirea pacienților cu cancer colorectal. În acest context, stadializarea anatomopatologică a neoplaziilor intestinului gros este recunoscută drept cel mai precis și constant instrument de evoluție și planificare a terapiei. Dar, parametrii clinicopatologici nu sunt întotdeauna suficienți, deoarece tumori similare din punct de vedere morfologic pot fi diferite în ceea ce privește arhitectura moleculară, iar analiza markerilor moleculari s-a dovedit a avea o semnificație prognostică, independentă de stadiu, contribuind astfel la o mai bună stratificare a adenocarcinoamelor de colon și rect. În consecință, identificarea de noi metode eficiente de diagnostic și explorarea mecanismelor moleculare ce stau la baza dezvoltării și progresiei CCR au reprezentat obiectivul principal al lucrării.

Prin urmare, pe măsură ce cunoștințele noastre despre structura și organizarea genomului celulei eucariote au evoluat, în obiectiv au apărut ARN-urile non-codante. Genele acizilor ribonucleici sunt reprezentate atât de specii de ARN cu rol activ în infrastructura celulară și sinteza proteinelor, cât și de specii funcționale de ARN non-codante (ARNnc) cu roluri versatile și vitale în homeostazia celulară (1).

Acizii micro-ribonucleici (miARN) sunt secvențe nucleare scurte de ARN prezente atât la procariote cât și la eucariote cu roluri funcționale importante într-o gamă largă de procese fiziologice și patologice. Deoarece numărul genelor miARN cunoscut este semnificativ mai mic decât numărul genelor codante proteice pe care le modulează, explorarea rolurilor miARN în adenocarcinoamele oferă o viziune globală și detaliată asupra arhitecturii moleculare (2).

În mod particular, expresia descentrată a miARN-urilor joacă un rol important în cercetarea clinică curentă, deoarece s-a demonstrat că unele dintre aceste miARN-uri, datorită specificității tisulare ridicate, expresiei unice și modificate din cancere, ar putea ajuta la diagnosticarea și în același timp la diferențierea CCR de alte boli ce implică intestinul gros. Mai mult, expresia pivotantă a miARN-urilor în rețelele de semnalizare celulară reprezintă un nou orizont în optimizarea și implementarea diagnosticului molecular la pacienții cu adenocarcinom

colorectal, obiectiv vital în personalizarea îngrijirii pacientului oncologic în funcție de caracteristicile clinicopatologice unice ale fiecărei tumori.

Înțelegerea completă a miARN-urilor în carcinogeneza colorectală este departe de a fi descifrat, deoarece expresia lor poate oscila și poate fi influențată de caracteristicile genetice, respectiv epigenetice unice ale diferitelor populații, precum și de factorii de mediu asociați fiecărei regiuni. În acest context, expresia miARN-urilor în România este foarte puțin studiată, iar datele obținute în urma studiului vor completa diagnosticul histopatologic și paraclinic al pacientului, fiind prezentate medicului clinician într-un mod integrat.

În lumina acestor date, în cadrul cercetării doctorale mi-am propus să investighez și să compar expresia unui panel de gene miARN în adenocarcinomul colorectal și mucoasa normală adiacentă și asocierea expresiei lor cu factorii clinicopatologici la pacienții din partea de sud-est a României. De asemenea, să explorez relevanța diagnostică și prognostică a speciilor de miARN selectate ca potențiali biomarkeri tisulari în cancerul colorectal. Identificarea unei semnături predictive specifice a speciilor de ARN non-codante la nivel tisular, ar putea contribui la o mai bună stratificare a adenocarcinoamelor colorectale și ar deschide calea spre noi oportunități de îmbunătățire a diagnosticului.

Partea generală

Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte a tezei de doctorat urmează stadiul actual al cunoștințelor în domeniul temei alese și este structurată în 3 capitole care abordează noțiuni teoretice despre cancerul colorectal-considerații generale, substratul molecular al carcinogenezei colorectale și genele acizilor microribonucleici. În partea a doua sunt prezentate ipotezele de cercetare, obiectivele, materialele și metodele utilizate, precum și rezultatele originale obținute în cadrul studiului doctoral.

În capitolul intitulat “*Cancerul colorectal-considerații generale*” sunt prezentate informații referitoare la epidemiologia, etiopatogenia, morfopatologia, diagnosticul și stadializarea cancerului colorectal. Din datele prezentate reiese situația epidemiologică a cancerului colorectal (CCR) la nivel mondial, afecțiune ce continuă să fie într-o continuă expansiune dinamică, cu aproximativ 1.3 milioane de noi cazuri diagnosticate și 694.000 de decese în 2012, reprezentând 10% din totalitatea neoplasmelor umane (<http://gco.iarc.fr>) (3). În România, CCR se situează pe locul doi cu 8.660 după cancerul pulmonar, raportat la numărul de cazuri, iar în ceea ce privește distribuția pe sexe, atât la bărbați cât și la femei, CCR ocupă locul trei cu 5.890 de cazuri noi la bărbați (după cancerul pulmonar și cel de prostată) și 3.310 cazuri noi la femei (după cancerul de sân și cel de col uterin) (4).

Deși, speranța de viață s-a ameliorat considerabil în ultimii ani ca urmare a îmbunătățirii managementului clinic și opțiunilor de tratament, CCR continuă totuși să fie principală cauză de deces în rândul tumorilor gastrointestinale. Întrucât această afecțiune neoplazică este în general asimptomatică în stadiile incipiente (stadiul I - II) și devine simptomatică în stadiile târzii (stadiul III – IV), când deja tumora s-a răspândit la țesuturile adiacente și/sau la ganglionii limfatici loco-regionali este imperios necesară stadializarea anatomo-patologică precisă și detecția precoce a leziunilor pre-maligne, pași esențiali în managementul pacienților cu CCR (5).

În clasificarea OMS sunt enumerate o serie de variante histologice ale tumorilor CCR. Cele mai frecvente sunt cele de origine epitelială (carcinoamele), cum ar fi adenocarcinomul, carcinoamele în “inel cu pecete”, carcinoamele medulare, carcinomul serat, carcinoamele de tip comedo-cribriform (6). Acest studiu se concentrează pe cel mai comun subtip de carcinom,

adenocarcinomul și, prin urmare, termenul de “cancer colorectal” sau “CCR” va fi folosit pentru a desemna acest subtip.

Neoplasmul de colon sau rect este definit ca un carcinom, de obicei adenocarcinom, care de regulă, se dezvoltă dintr-un precursor neoplazic, adenoame, polipi hiperplazici, mezenchimali sau inflamatori ce pot fi tubulari, vilozii, tubulo-vilozii sau serot-sesili în arhitectură (7).

Stadializare histopatologică constituie un factor cheie în planificarea terapiei și evoluția bolii și se bazează pe utilizarea un sistem universal acceptat pentru a descrie extinderea locală a tumorii primare (T), diseminarea acesteia la ganglionii limfatici locoregionali (N) și extensia la organele vecine - metastazarea (M) și anume, sistemul Tumoră-Nod-Metastaze (TNM) propus de American Joint Committee on Cancer (AJCC) și Union International Contre le Cancer (UICC) (8).

În capitolul ”**Substratul molecular al carcinogenezei colorectale**” este aprofundată eterogenitatea genomică, epigenetică și transcriptomică a carcinogenezei colorectale. Relația de interdependență dintre modificările identificate la nivel molecular și progresia tumorală au fost postulate pentru prima dată de Vogelstein și Fearon în 1990, model care timp de două decenii a reprezentat paradigma evenimentelor genetice și epigenetice întâlnite în cancerul colorectal, constituind un exemplu de evoluție fiziopatologică pentru multe alte tipuri de cancere (9).

Trei mecanisme moleculare sunt implicate în CCR și anume, instabilitatea cromozomială (CIN), instabilitatea microsateiților (MSI) și fenotipul metilator al insulelor CpG (CIMP).

Instabilitatea cromozomială cunoscută și sub numele de secvența adenom-carcinom constituie cel mai frecvent tip de dezechilibru genetic, întâlnit în 85% din cazurile de CCR. Mecanismele care stau la baza CIN, includ pierderea sau câștigul unor segmente cromozomiale sau cromozomi întregi, într-o rată crescută comparativ cu celulele normale, disfuncția telomerelor ca răspuns la deteriorarea ADN-ului și modificări în expresia genelor implicate în menținerea homeostaziei celulare (10).

Dereglarea funcțională a sistemului post-replicativ (MMR), responsabil de repararea împerecherilor greșite dintre perechile de baze azotate complementare este frecvent ținta unor agenți mutageni externi sau interni. La om, sistemul MMR implică intervenția unui sistem alcătuit din 6 enzime mutator, ce recunosc erorile de replicare, codificate de genele hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hPMS1 și hPMS2. Acest fenomen se produce frecvent în cazul microsateiților, repetiții foarte scurte de 1-6 pb, mono-, di-, tri- sau tetranucleotidice de tipul

(CA)_n sau (A)_n, distribuite uniform în genom, prin care o alelă germinală microsatelitară prezintă adiția sau deleția unor unități repetitive scurte ce îi modifică lungimea somatică, denumit instabilitatea microsateliților – MIN sau MSI (11).

De asemenea, cercetările recente asupra CCR au relevat existența unor loci care sunt metilați în grup, fenomen denumit fenotip metilator al insulelor CpG (CIMP, CpG island methylator phenotype), observat în peste 15% dintre cazuri. În funcție de gradul de hipermetilare, CCR pot fi împărțite fenotip metilator al insulelor CpG de grad înalt (CIMP-H) și fenotip metilator al insulelor CpG de grad scăzut (CIMP-L) (12).

În capitolul ”***Genele acizilor micro-ribonucleici***” sunt trecute în revistă informații referitoare la descoperirea, biogeneza, mecanismul de acțiune și rolul genelor microARN în neoplaziile umane.

Funcțional, microARN-urile (miARN) reprezintă o clasă nouă de ARN-uri mici, puternic conservate filogenetic, cu lungimi cuprinse între 18-25 de nt, non-codante, cu rol în managementul expresiei genice la nivelul post-transcripțional (13). Procesul de maturare al miARN începe în nucleu sub acțiunea ARN polimerazei II ce transcrie catena matriță a genelor miARN, cu generarea unui transcript primar lung, denumit pri-microARN (> 1000 nt). Structura secundară a transcriptului primar este clivată enzimatic de Drosha în pre-miARN. Aceste pre-miARN sunt alcătuite din 70 de nucleotide și cuprind mai multe structuri de tip tijă-bucă, fiind translocate în citoplasmă prin intermediul enzimei Exportin-5 unde suferă maturarea finală, într-un miARN funcțional de aproximativ 22 nucleotide, proces catalizat de riboendonuclează III Dicer (14).

Preponderent, miRNA-urile își exercită funcționalitatea în modularea post-transcripțională a expresiei genice prin legarea directă la regiunea netranslată 3’UTR din ARN mesager, ceea ce duce la scindarea și degradarea sau suprimarea translației (15). Cea mai recentă versiune a bazei de date miRBase (<http://www.mirbase.org>) conține peste 28645 de miARN mature, validate experimental din peste 193 de specii, clasificate în clustere și familii pe baza secvenței lor nucleotidice centrale sau a relației genomice (16). În consecință, practic toate procesele proliferative, regenerative și fiziopatologice par să fie cel puțin parțial reglementate de moleculele de miARN (17).

Contribuția personală

Ipoteze de cercetare

Analizând datele publicate anterior și consultând bazele de date Sanger Center Registry (www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index) și miRBase (www.mirbase.org) în studiul doctoral mi-am propus să testez următoarele *ipoteze de cercetare*:

1. Dacă expresia diferențiată a genelor miARN selectate este asociată cu diferite etape ale patogenezei cancerului colorectal, deoarece s-a demonstrat că miARN-urile pot avea o semnificație prognostică, independentă de stadiu, contribuind astfel la o mai bună stratificare a adenocarcinoamelor de colon și rect.
2. Dacă moleculele de miARN pot servi ca potențiali biomarkeri tisulari cu specificitate și sensibilitate ridicată în rândul pacienților cu cancer colorectal din România, având în vedere că expresia lor poate oscila și poate fi influențată de caracteristicile genetice, respectiv epigenetice unice ale diferitelor populații, precum și de factorii socio-economici asociați fiecărei regiuni.

Din ipotezele formulate mai sus au rezultat obiectivele principale și secundare ale tezei.

Obiective principale:

1. Analiza variabilelor demografice, morfopatologice și imunohistochimice a cazurilor incluse în studiu.
2. Cuantificarea expresiei genelor miARN și ARNm selectate în eșantioanele tumorale și cele de mucoasă normală adiacentă prin metoda RT-qPCR.
3. Evaluarea utilității clinice, diagnostice și prognostice a speciilor de miARN selectate ca potențiali biomarkeri tisulari.
4. Evidențierea unor posibile corelații între expresia speciilor de miARN, respectiv ARNm cu variabilele clinice și histopatologice.
5. Stabilirea relației de asociere dintre genele miARN și ARNm cu identificarea eventualelor duplexuri miARN-ARNm în CCR.

Obiective secundare:

1. Prelucrarea pieselor operatorii/biopsiilor în vederea diagnosticului histopatologic și imunohistochimic.
2. Izolarea și purificarea ARNt, inclusiv a speciilor de miARN din probele de țesut tumoral și țesut non-tumoral adiacent pereche (NOR).
3. Determinarea purității, cantității și integrității eșantioanelor de ARN prin spectrofotometrie, fluorometrie și electroforeză microcapilară.
4. Revers-transcrierea moleculelor de ARN din probele tumorale, respectiv NOR în ADN complementar (ADNc), etapă realizată cu ajutorul amorsoarelor tijă-bucă (stem-loop) specifice în cazul speciilor de miARN sau cu ajutorul primerilor hexamamerici cu secvență aleatorie (random primers) în cazul moleculelor de ARNm.
5. Amplificarea și cuantificarea expresiei genelor miARN mature (hsa-miR-30c, -375, -195, -214, -144, -145, -143, -299, -21, -141, -182, -183 și -370) și ARNm (PTEN, TP53, MSH6, mTOR și PIK3CA) prin tehnica qPCR utilizând sonde de hidroliză specifice TaqMan®MGB.
6. Normalizarea, analiza și interpretarea datelor obținute cu ajutorul softurilor statistice.

Metodologia cercetării

Selecția cazurilor

Acest studiu a inclus un număr de 41 de perechi de țesuturi tumorale și adiacente non-tumorale (situate la cel puțin 5 cm distanță de leziunea tumorală), colectate de la pacienți diagnosticați cu cancer de colon sau rect, internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență „Sf Apostol Andrei” Constanța (SCJU) pe secțiile de Chirurgie și Gastroenterologie. Prelucrarea și diagnosticarea pieselor operatorii/biopsiilor s-a realizat în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică (SCAP) într-o manieră sistematică, urmând protocoale specifice de lucru existente în cadrul laboratorului și cu acordul Comisiei Locale de Etică pentru Aprobarea Studiilor Clinice și de Cercetare (Nr: 30367/23.06.2020).

O secțiune din fiecare eșantion (tumoral și non tumoral) a fost colorată cu hematoxină-eozină și evaluată de către un medic anatomopatolog cu experiență pentru stabilirea caracteristicilor arhitecturale ale tumorii, gradului de diferențiere, producției de mucus,

aprecierea componentei fibro-conjunctive, prezenței zonelor de necroză, extensiei vasculare și perineurale sau invaziei marginilor de rezecție. Toate eșantioanele tumorale utilizate în acest studiu au fost clasificate histologic ca adenocarcinoame de colon sau rect, în conformitate cu sistemul de stadializare tumora-nod-metastază (TNM) al OMS privind tumorile sistemului digestiv, ediția a 7-a din 2010 (8). Înainte ca piesa să fie fixată în formol, o mostră de țesut a fost îndepărtată din componenta invazivă tumoral, respectiv din țesutul adiacent normal și imersate imediat în soluție de stabilizare RNAlater® pentru testarea moleculară.

Caracteristicile demografice, datele clinice și patologice ale celor 41 de pacienți incluși în studiu au fost obținute prin accesarea registrelor electronice și rapoartelor de analize medicale, fiind actualizate la fiecare 6 luni.

Metode de cercetare

Extracția și cuantificarea speciilor de miARN/ARNm

Moleculele miARN și ARNm au fost izolate și purificate folosind kit-ul miRNeasy de la Qiagen, protocol adaptat condițiilor specifice din laboratorul de biologie moleculară. Aproximativ 30 mg de țesut au fost omogenizate în 700 μl tampon de liză timp de 90 sec. După adăugarea cloroformului, amestecul s-a separat prin ultra-centrifugare în două faze distincte, o fază transparentă superioară și una inferioară organică de culoare roz. Moleculele de ARN se regăsesc în faza apoasă superioară, în timp ce ADN-ul și proteinele se găsesc la nivelul interfazei sau în faza organică inferioară. Faza apoasă superioară a fost precipitată prin adăugarea de etanol 100%, obținându-se o soluție adecvată legării tuturor moleculele de ARN cu lungimii mai mari de 18 nt. Ulterior, proba a fost transferată în minicoloana RNeasy Mini, în care moleculele de ARN s-au legat selectiv la membrana de siliciu, în prezența sărurilor chaotropice, iar fenolul și alți contaminanți au fost spălați eficient prin filtrare în câmp centrifugal. În ultima etapă, ARN-ul de înaltă calitate a fost eluat de pe membrană în 30 μl de apă liberă de DNaze/RNaze.

Puritatea soluțiilor de ARN a fost evaluată prin măsurarea densității optice la 260/280 nm și 280/320 nm folosind spectrofotometrul NanoDrop One™, unde valorile rapoartelor cuprinse între $OD_{260/280} = 1.8 - 2.2$ și $OD_{260/230} > 1.8$ au fost considerați indicatori acceptabili de calitate. Concentrația probelor a fost măsurată folosind fluorometrul Qubit®3.0 și reactivul Qubit® RNA

HS, iar integritatea moleculelor de ARN total cu rezoluție crescută s-a realizat prin electroforeză microcapilară, utilizând bioanalizorului automat 2200 TapeStation și kit-ul RNA ScreenTape.

Revers-transcrierea și detecția speciilor de miARN/ARNm prin PCR în timp real

Reacția de revers-transcriere (RT) a moleculelor de miARN și ARNm în ADN complementar (ADNc) s-a realizat cu ajutorul kit-ului TaqMan®MicroRNA Assay, respectiv SuperScript™ Vilo™ cDNA Synthesis. Pentru speciile de miARN, reacția a fost inițiată cu ajutorul amorsoarelor tijă-bucă (stem-loop) specifice pentru fiecare specie de miARN în parte, iar pentru moleculele de ARNm am folosit primeri hexamamerci cu secvență aleatorie (random primers). Concentrația de ARN a fost cuprinsă între 1-10 ng per 15 μl de amestec de reacție în cazul speciilor de miARN, respectiv 1000 ng per 20 μl în cazul moleculelor de ARNm. Fiecare reacție RT în cazul moleculelor de miARN constă din 7 μl amestec principal (0,15 μl dNTP, 1 μl enzimă RT Multiscribe, 1,5 μl 10 x RT Buffer, 0,19 μl inhibitor RNazic și 4,16 μl apă liberă de nucleaze), 3 μl primer și 5 μl ARN. În cazul moleculelor de ARNm, amestecul principal RT conține 4 μl SuperScript™ VILO™ MasterMix, 6 μl ARN și 10 μl apă.

În etapa a doua, catena complementară de ADN a fost sintetizată folosind kitul TaqMan Fast Advanced Master Mix și sonde de hidroliză TaqMan specifice. Fiecare reacție de 20 μl conține: 10 μl Fast Advanced Master Mix, 7,67 μl apă liberă de nucleaze, 1,33 μl produs din reacția RT și 1 μl TaqMan®MicroRNA Inventorieted/TaqMan®Gene Expression Inventorieted.

Reacția de amplificare în timp real (qPCR) pentru detectarea nivelului de expresie a genelor selectate s-a realizat cu ajutorul analizorului ABI 7500 Fast qPCR în 40 de cicluri, în care fiecare ciclu de amplificare constă dintr-o etapă de inițială de denaturare la 95 °C timp de 3 secunde și o etapă de atașare/elongare a primerilor cu clivarea sondei la 60 °C timp de 30 sec. Fluorescența a fost detectată la sfârșitul fiecărui ciclu de amplificare. Un control negativ fără matriță a fost utilizat în toate reacțiile qRT-PCR.

Normalizarea și cuantificarea datelor qPCR

Pentru estimarea nivelului de expresie al genelor selectate în teză am utilizat cuantificare relativă datorită flexibilității sale superioare și variației inerent reduse în pregătirea probelor. Metoda implică compararea valorilor Ct (ciclu prag a fost utilizat ca unitate de măsură) obținute pentru gena de interes din țesutul tumoral cu un calibrator, în cazul de față o probă din țesutul

normal adiacent. La rândul lor, valorile Ct din eşantioanele tumorale şi non-tumorale sunt normalizate la o genă de referinţă din acelaşi eşantion, genă a cărei expresie nu se modifică în condiţiile testate. În studiul de faţă, pentru normalizarea expresie genice s-au folosit două controale, miR-26b, respectiv miR-92N ($P = 0.60$, $P = 0.58$; t-test pereche) în cazul speciilor de miARN şi GADPH ($P = 0.29$) pentru ARNm. Pentru fiecare probă, reacţiile au fost efectuate în triplicat, atât pentru speciile de miARN/ARNm de interes cât şi pentru controale, iar datele obţinute au fost analizate utilizând ecuaţia $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (18). Dacă valoarea raportului RQ este supraunitară, expresia genei analizate este supraexprimată, iar dacă valoarea este subunitară, gena este subexprimată. În cazul unei valori unitare se consideră că gena are acelaşi nivel de expresie în cele două eşantioane.

Analiza statistică a datelor

Rezultatele obţinute au fost analizate cu ajutorul software-ului SPSS versiunea 20 şi Medalc versiunea 19.0.3. Independent Sample T-test a fost utilizat pentru testarea diferenţei statistice între cele două eşantioane (CCR vs NOR) pentru panelul de gene selectate. Corelaţiile dintre variabilele cantitative şi calitative (nivelul expresiei genelor analizate în raport cu parametrii anatomopatologici) a fost efectuat prin testele non-parametrice Mann-Whitney (U) pentru compararea a 2 grupuri sau Kruskal-Wallis (H) pentru mai mult de 2 grupuri., unde un nivel de prag de 5% (< 0.05) este considerat semnificativ statistic pentru respingerea ipotezei nule.

Analiza curbei ROC a fost utilizată pentru a determina performanţa diagnostică a speciilor de miARN selectate în diferenţierea celor două eşantioane (CCR vs NOR), iar valoarea optimă de cut-off a fost calculată pe baza indicelui Youden (sensibilitate + [100% - specificitate]) care maximizează AUC.

Coeficientul non-parametric Spearman (Rho) a fost utilizat pentru testarea corelaţiei lineare dintre două variabile cantitative, în cazul de faţă între expresia genelor miARN cu ARNm. Regresia logistică univariată şi multivariată a fost folosită pentru a determina dacă parametrii clinici şi histopatologic luaţi în calcul sau speciile de miARN selectate reprezintă factori prognostici independenţi ce pot contribui în mod semnificativ la apariţia CCR.

Rezultate

Caracteristicile demografice și clinicopatologice ale lotului

Din cei 41 de pacienți incluși în studiu, 20 de pacienți (48.7%) au fost bărbați și 21 au fost femei (51.2%); vârsta medie $\pm$ SD a lotului a fost de 69.5 ± 8.53 , cu extreme de vârstă cuprinse între 48 și 89 de ani. Conform examenului histopatologic, toți pacienți incluși în studiu au fost diagnosticați cu adenocarcinom de colon sau rect.

Localizarea leziunii primare a fost în colonul proximal în 39% (n = 16), colonul distal în 34.14% din cazuri (n = 14) și rect în 26.82% din cazuri (n = 11).

Statistic în colonul proximal au predominat leziunile ulcero-vegetante în 21.9% din cazuri, urmate de cele ulcerate cu 12.1% și poliploide cu 4.87%. Colonul distal a fost reprezentat de leziuni ulcerat-infiltrative în 17.0% din cazuri, ulcerat-vegetante în 7.31% și poliploide în 2.43%.

În funcție de gradul diferențieri tumorale, 21.95% (9/41) din cazuri sunt tumori bine diferențiate, 73.18% (30/41) moderat diferențiate și 4.87% (2/41) slab diferențiate. În colonul proximal au predominat leziunile moderat diferențiate (29.2%), urmate de cele slab diferențiate (4.87%), respectiv bine diferențiate (2.43%); colonul distal a fost reprezentat în 17.0% din cazuri de adenocarcinoame moderat diferențiate, respectiv bine diferențiate (14.6%), în timp ce rectul a fost reprezentat de 21.9% moderat, respectiv 9.75% tumori bine diferențiate.

Analiza imunohistochimică a proteinelor nucleare

Analiza IHC a fost efectuată pe 26 (63.41%) de eșantioane de țesut CCR. Proteinele hMLH1 și hPMS2 nu au fost exprimate la o femeie de 48 de ani (cazul 10) și un bărbat infiltrat în vârstă de 71 de ani (cazul 29), ambii cu infiltrație adenocarcinom de colon proximal (cecum), moderat diferențiat și fără antecedente familiale de cancer documentate. Expresia proteinei hPMS2 a fost negativă în țesuturile tumorale prelevate de la o femeie de 77 de ani (cazul 14) cu adenocarcinom de cecum mucinos, grad înalt de malignitate, fără istoric familial de cancer.

Pierderea expresiei proteinelor hMSH6 și hMSH2 a fost observată la o femeie de 74 de ani (cazul 33) și un bărbat în vârstă de 84 de ani (cazul 34), ambii cu adenocarcinom de colon proximal (cecum), moderat diferențiat. Se poate concluziona că toate tumorile au fost localizate

în colonul proximal, iar supresia heterodimerilor MSH6/MSH2 a fost observată în 2 cazuri, în timp ce a MLH1/PMS2 în 3 cazuri.

Expresia genelor miARN

Media valorilor ΔC_t a fost utilizată pentru testarea diferenței statistice dintre cele două eșantioane (NOR vs CCR), iar mediana valorilor expresiei relative (RQ) pentru a afla de câte ori o genă este mai mare (supraexprimată) sau mai mică (subexprimată) la pacienții cu CCR.

Speciile de miARN analizate s-au dovedit a fi exprimate diferit în țesutul tumoral colorectal în comparație cu probele normale de țesut adiacent (Tabel 1). Astfel, cinci miARN-uri au fost supraexprimate și opt subexprimate.

Dintre miARN-urile găsite a fi suprareprezentate în studiul de față, miR-21 a avut o expresie crescută în 90% din cazuri, figura 1A (37/41; $P < 0.001$), miR-141 în 75% din cazuri, figura 1B (31/41; $P < 0.002$), miR-182 în 92% din cazuri, figura 1C (38/41; $P < 0.001$), miR-183 în 87% din cazuri, figura 1D (36/41; $P < 0.001$) și miR-370 în 87% din cazuri, figura 1E (36/41; $P < 0.001$). Expresia relativă al genelor miR-182, miR-183 și miR-370 în probele tumorale au prezentat cele mai mari valori. Într-adevăr, miR-182 a fost exprimat de aproximativ 5.4 ori mai mult în țesutul tumoral, miR-183 de aproximativ 4.7 ori și miR-370 de aproximativ 4.0 ori, în timp ce supraexpresia genei miR-141 a fost de doar 1.69 ori.

Prin opoziție, genele miR-30c, miR-144, miR-375, miR-214, miR-195, miR-143, miR-145 și miR-299 au fost semnificativ reduse în CCR în raport cu NOR. Astfel, miR-30c a fost subexprimat în 78% din cazuri, figura 1F (32/41; $P < 0.001$), miR-144 în 63% din cazuri, figura 1G (26/41; $P = 0.02$), miR-375 în 78% din cazuri, figura 1H (32/41; $P < 0.001$), miR-214 în 70% din cazuri, figura 1L (29/41; $P = 0.04$), miR-299 în 70% din cazuri (29/41; $P = 0.20$), miR-143 în 80% din cazuri, figura 1J (33/41; $P < 0.007$), miR-145 în 85% din cazuri, figura 1K (35/41; $P < 0.001$) și miR-195 în 90% din cazuri, figura 2I (37/41; $P < 0.001$). În ceea ce privește nivelul expresiei relative, genele miR-375, miR-195, miR-145 și miR-144 au prezentat cele mai mari valori în eșantioanele tumorale. Într-adevăr, miR-375 a fost redus de aproximativ 19 ori în țesutul tumoral, miR-195 de aproximativ 4.6 ori, miR-145 de 21 de ori, iar miR-144 a fost subexprimat de 2.2 ori. Raportul expresie relative pentru miR-299 sugerează că este subexprimat de aproximativ 1,7 ori, dar fără o semnificație statistică.

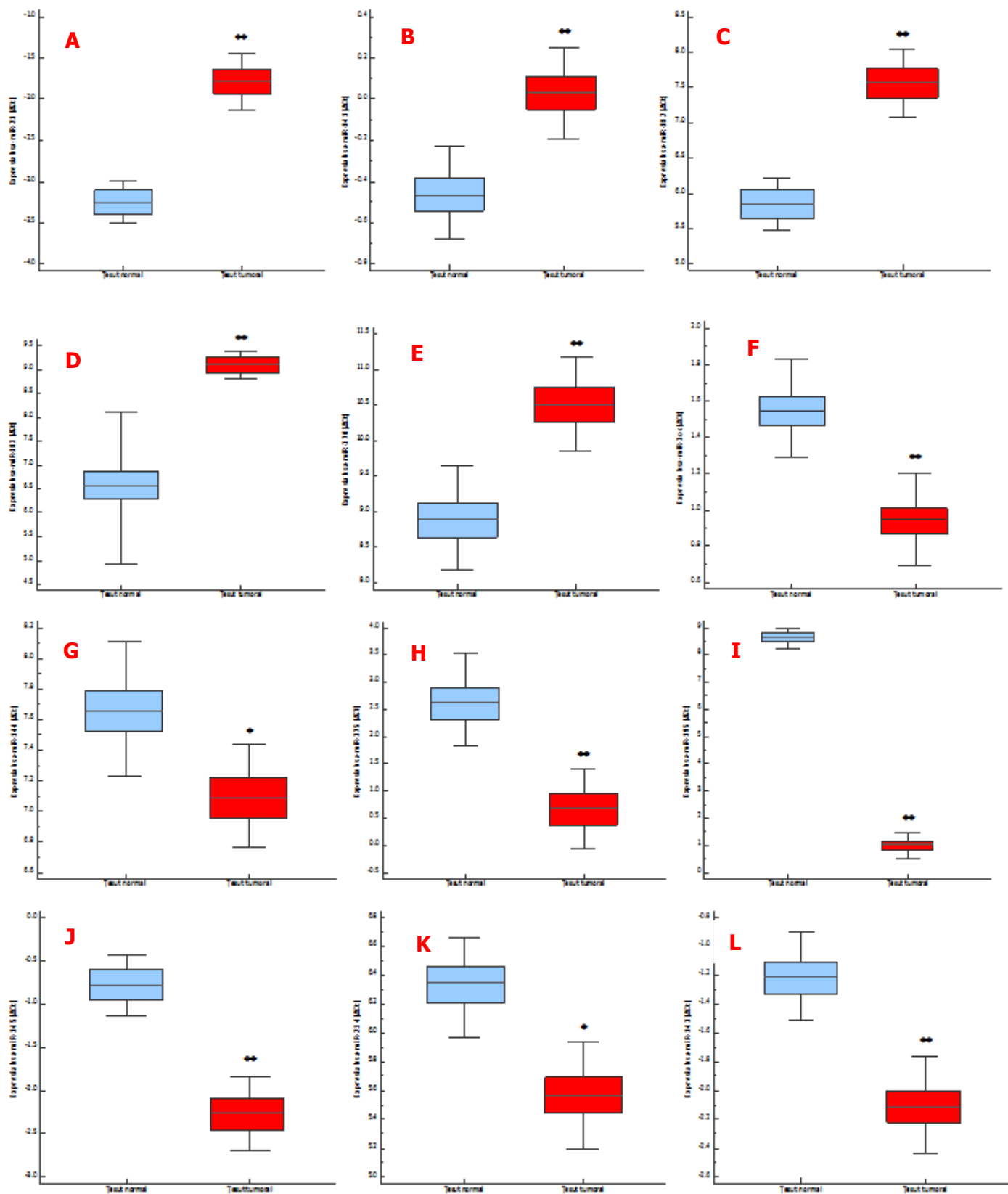


Figura 1. Expresia speciilor de miARN selectate (ΔC_t) în eșantioanele tumorale colorectale (CCR) în raport cu eșantioanele adiacente non-tumorale (NOR).

Tabel 1. Speciile de miARN supraexprimate sau subexprimate în țesutul tumoral comparativ cu mucoasa normală pereche

miARN	Țesut Normal (ΔC_t)		Țesut tumoral (ΔC_t)			Expresia relativă - RQ ($1/2^{-\Delta\Delta C_t}$)					
	Media $\pm$ SD	Media 95% CI	Media $\pm$ SD	Media 95% CI	P*	Valoarea minimă	Valoarea maximă	Mediana	Mediana 95% CI	Expresia relativă	P**
miR-30c	1.55 $\pm$ 0.86	1.28 – 1.83	0.94 $\pm$ 0.81	0.69 – 1.20	< 0.001	0.42	8.43	1.50	1.25 – 1.96	1.80	< 0.001
miR-375	2.67 $\pm$ 2.72	1.81 – 3.53	0.67 $\pm$ 2.32	-0.06 – 1.40	< 0.001	0.10	155.41	2.93	1.74 – 4.81	19.01	< 0.001
miR-195	0.98 $\pm$ 1.50	0.51 – 1.46	8.60 $\pm$ 1.16	8.25 – 8.95	< 0.001	0.61	63.29	2.79	2.26 – 3.41	4.65	< 0.001
miR-143	-1.20 $\pm$ 1.41	-1.51 – -0.89	-2.09 $\pm$ 1.55	-2.44 – -1.75	< 0.001	0.15	46.62	1.58	1.31 – 3.00	5.07	< 0.001
miR-145	-0.78 $\pm$ 1.63	-1.14 – -0.42	-2.26 $\pm$ 1.91	-2.68 – -1.84	< 0.001	0.12	514.13	1.99	1.43 – 3.11	21.73	< 0.001
miR-214	6.31 $\pm$ 1.08	5.97 – 6.65	5.56 $\pm$ 1.18	5.19 – 5.94	0.047	0.20	6.87	1.41	1.19 – 1.87	1.96	< 0.001
miR-144	7.67 $\pm$ 1.39	7.22 – 8.11	7.10 $\pm$ 1.05	6.76 – 7.43	0.026	0.32	15.42	1.14	0.97 – 2.58	2.25	< 0.001
miR-299	9.20 $\pm$ 1.14	8.79 – 9.61	8.94 $\pm$ 1.26	8.49 – 9.39	0.37	0.24	7.43	1.28	1.06 – 1.93	1.76	0.054
miR-21	-3.24 $\pm$ 0.81	-3.50 – -2.98	-1.78 $\pm$ 1.09	-2.12 – -1.43	< 0.001	0.03	13.96	3.34	2.62 – 4.63	4.19	< 0.001
miR-141	-0.45 $\pm$ 1.70	-0.67 – -0.23	0.02 $\pm$ 1.70	-0.19 – -0.25	< 0.001	0.45	5.51	1.33	1.15 – 1.44	1.69	< 0.001
miR-182	5.35 $\pm$ 1.16	5.48 – 6.21	7.55 $\pm$ 1.55	7.06 – 8.03	< 0.001	0.24	15.28	4.92	2.34 – 6.03	5.41	< 0.001
miR-183	6.51 $\pm$ 5.01	4.93 – 8.09	9.09 $\pm$ 0.89	8.81 – 9.37	< 0.001	0.13	24.81	4.70	2.41 – 5.46	5.52	< 0.001
miR-370	8.92 $\pm$ 2.05	8.19 – 9.64	10.50 $\pm$ 1.85	9.84 – 11.16	< 0.001	0.53	22.67	2.54	1.77 – 3.52	4.01	< 0.001

SD – Deviație standard; 95% CI – Interval de confidență; RQ – Expresia relativă; * Independent sample t-test; ** Signed rank-sum test.

Analiza expresiei genelor miARN

Analiza tiparelor expresiei genice în patologia cancerelor de colon și rect oferă o viziune globală și detaliată asupra arhitecturii genelor implicate în tumorigeneză. Rezultatele studiului au demonstrat expresia genică diferențiată pentru PTEN, PIK3CA, MSH6, mTOR și TP53 în țesutul tumoral în comparație cu mucoasa normală adiacentă. Astfel, gena PTEN a avut o expresie scăzută în 65% din cazuri, figura 2A (27/41; $P < 0.001$), MSH6 în 73% din cazuri, figura 2B (30/41; $P < 0.002$) și TP53 în 56% din cazuri, figura 2C (23/41; $P < 0.001$), iar ambele gene PIK3CA și mTOR au avut o expresie crescută în 70% din cazuri, figurile 2D și 2E (29/41; $P < 0.01$).

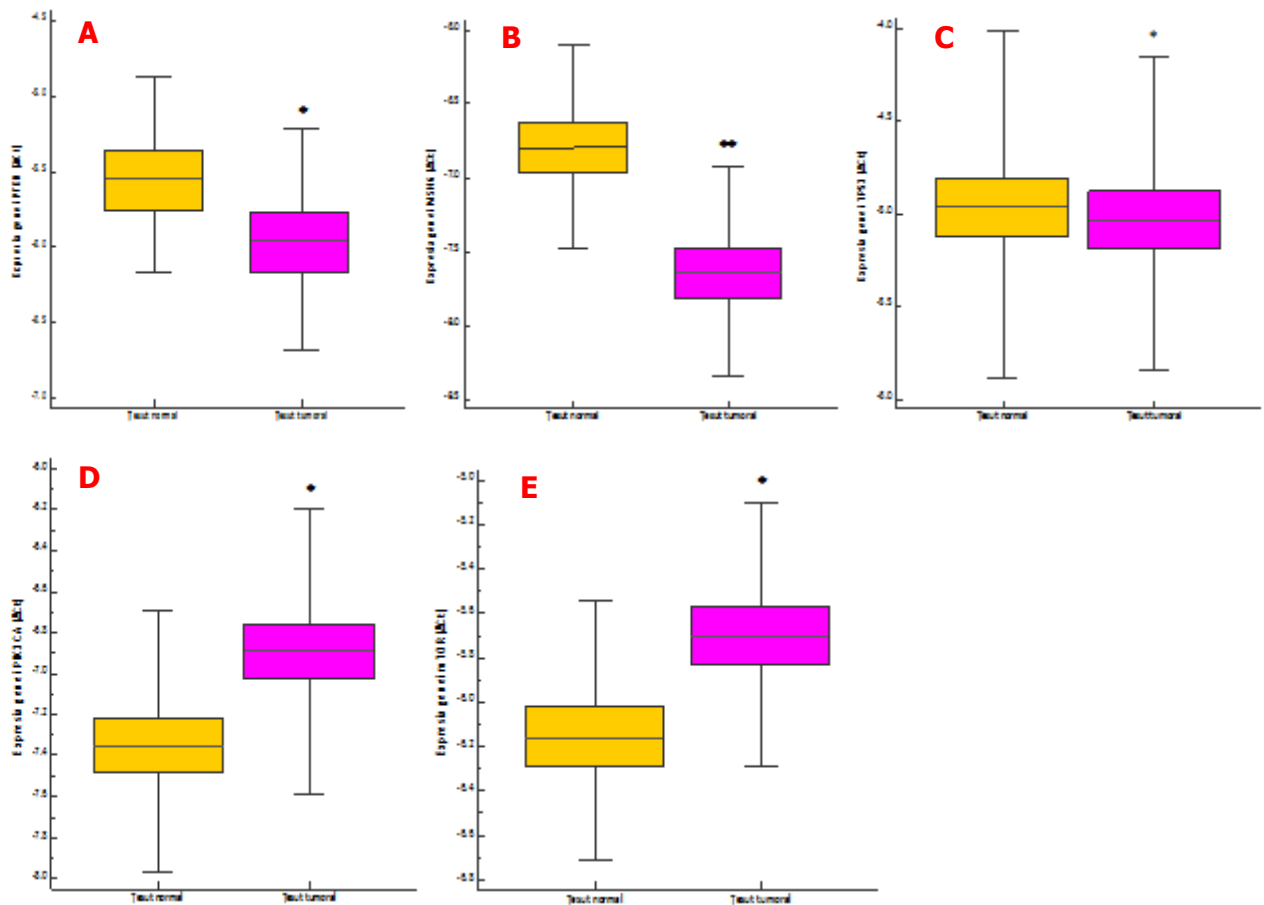


Figura 2. Nivelurile de expresie ale genelor ARNm selectate (ΔC_t) în eșantioanele tumorale colorectale (CCR) în raport cu eșantioanele adiacente non-tumorale (NOR).

Fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN

Analiza de funcționare a receptorului (ROC) și regresia logistică univariată și multivariată au fost utilizate pentru a determina fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN selectate de a funcționa ca biomarkeri tisulari în CCR.

Fezabilitatea diagnostică a genelor miARN studiate a fost evaluată prin reprezentarea bidimensională a curbelor ROC, folosind indicatori de performanță cum ar fi sensibilitatea (rata real pozitivă) și specificitatea (rata fals pozitivă) în diferite puncte limită (indicele Youden). Zona de sub aria curbei ROC reflectă probabilitatea identificării corecte a țesuturilor tumorale de țesuturile non-tumorale la pacienții cu CCR.

Astfel, dintre miARN-urile cu funcții supresoare tumorale, miR-30c (Figura 3A), miR-375 (Figura 3B), miR-195 (Figura 3C), miR-143 (Figura 3D), miR-145 (Figura 3E), miR-144 (Figura 3F), miR-214 (Figura 3G) și miR-299 au prezentat următoarele valori AUC, 0.36 (CI: 0.51 – 0.73), 0.76 (0.69 – 0.82), 0.79 (0.69 – 0.87), 0.74 (0.67 – 0.81), 0.83 (0.73– 0.90), 0.63 (0.51–0.73) și 0.68 (0.57 – 0.78). Se observă că miR-145 (Sensibilitate - 82.93, Specificitate - 85.37; $P < 0.001$), miR-195 (Sensibilitate – 78.05, Specificitate – 78.05; $P < 0.001$), miR-375 (Sensibilitate – 75.61, Specificitate – 80.49; $P < 0.001$) și miR-143 (Sensibilitate – 60.98, Specificitate – 80.49; $P < 0.001$) au prezentat cele mai bune valori ale indicatorilor de performanță.

În ceea ce privește miARN-urile cu funcții oncogene, miR-182 (Figura 3H), miR-183 (Figura 3I), miR-141 (Figura 3J), miR-21 (Figura 3K) și miR-370 (Figura 3L) au prezentat următoarele valori AUC, respectiv 0.91 (0.82 – 0.96), 0.86 (0.77 – 0.93), 0.68 (0.57 – 0.68), 0.73 (0.62 – 0.82) și 0.74 (0.67 – 0.80). Dintre cele cinci oncomiruri, miR-182 (Sensibilitate – 87.80, Specificitate – 90.24; $P < 0.001$), miR-183, (Sensibilitate – 75.61, Specificitate – 92.68; $P < 0.001$), miR-370 (Sensibilitate – 65.85, Specificitate – 76.83; $P < 0.001$) și miR-21 (Sensibilitate – 69.51, Specificitate – 85.37; $P < 0.001$) au prezentat cele mai bune valori ale indicatorilor de performanță.

Mai mult, în analiza univariată și multivariată (regresia Cox), statusul nodal, apariția metastazelor, miR-30c, miR-144, miR-375, miR-214, miR-21, miR-195, miR-141, miR-182, miR-183 și miR-370 reprezintă factori prognostici predictivi independenți și importanți asociați în rândul pacienților cu CCR (Tabel 2).

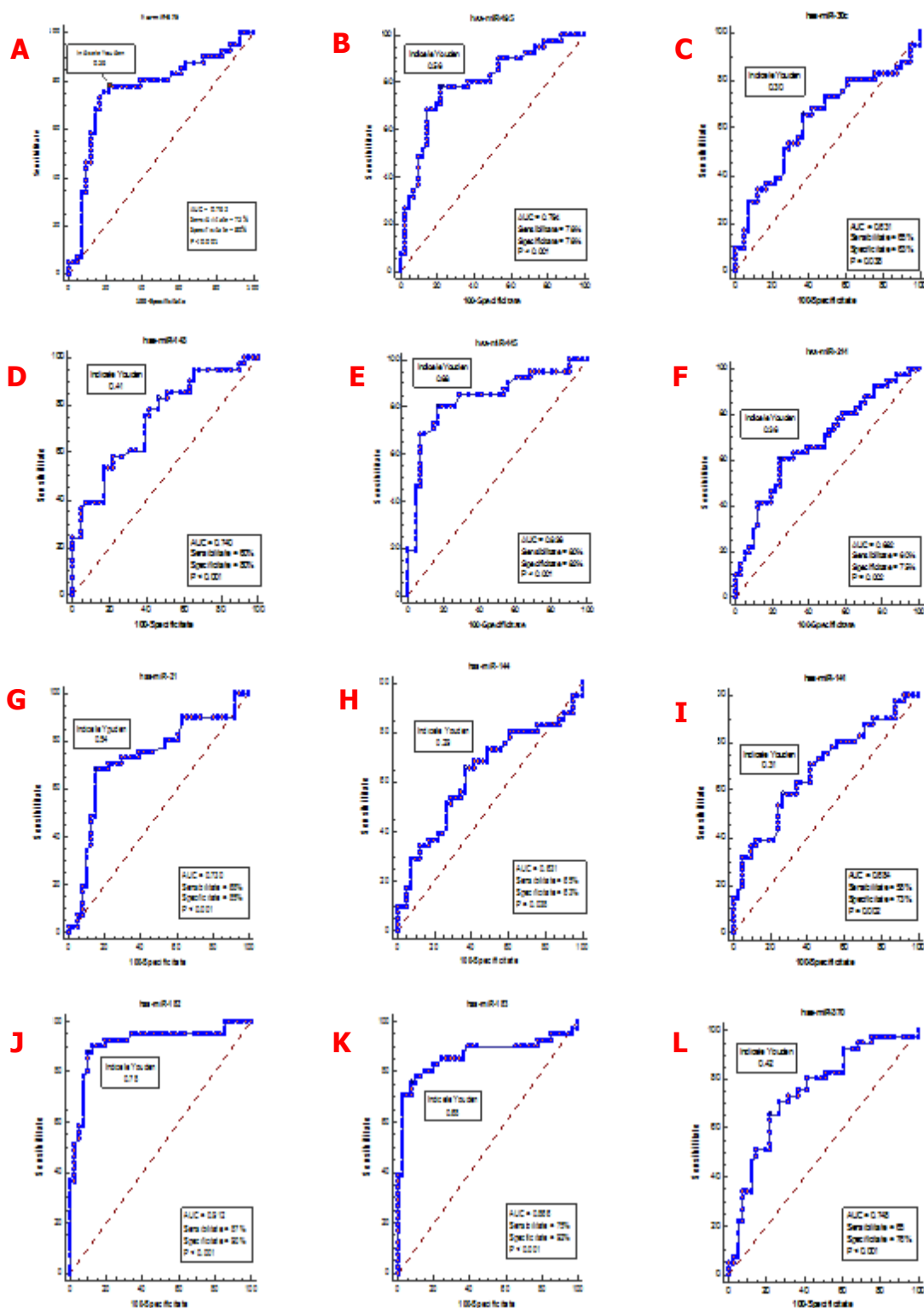


Figura 3. Expresia diagnostică a genelor miARN selectate în rândul pacienților cu CCR. Pentru determinarea valorii diagnostice a miARN-urilor selectate în probele CCR vs NOR a fost efectuată analiza ROC și generată grafic aria de sub curba ROC (AUC).

Tabel 2. Regresia logistică univariată, respectiv multivariată și valoarea prognostică a miARN selectate, respectiv factorii clinicopatologici asociați în rândul pacienților cu CCR.

Variabilele clinicopatologice	Analiza univariată			Analiza multivariată		
	Hazard ratio	95% CI [†]	P	Hazard ratio	P	95% CI [†]
Vârsta	1.65	0.73 - 3.98	0.32	–	–	–
Sexul	1.23	1.07 - 3.50	0.32	–	–	–
Locația tumorii	1.52	1.28 - 3.79	0.63	–	–	–
Starea ganglionilor	1.23	1.26 - 3.86	0.049	–	–	–
Invazia tumorii	2.83	0.88 - 7.29	0.035	3.86	0.012	0.77 - 3.90
Metastaze	6.32	0.79 - 1.17	0.023	3.29	0.035	1.00 - 3.54
Dimensiunea	2.62	0.10 - 9.31	0.032	2.17	0.047	1.29 - 3.79
Hsa-miR-30c	3.62	1.02 - 5.31	0.032	4.97	0.012	1.02 - 5.24
Hsa-miR-144	3.23	0.81 - 5.06	0.028	3.31	0.016	0.80 - 5.51
Hsa-miR-375	3.22	0.65 - 5.90	0.012	2.06	0.035	0.88 - 5.22
Hsa-miR-214	3.95	0.54 - 5.88	0.023	4.90	0.014	1.00 - 3.54
Hsa-miR-21	3.76	1.00 - 5.20	0.001	1.88	0.042	1.29 - 3.79
Hsa-miR-195	2.86	0.82 - 5.56	0.001	2.20	0.034	1.24 - 3.86
Hsa-miR-141	2.41	0.79 - 6.17	0.035	1.00	0.023	0.80 - 5.51
Hsa-miR-182	2.32	0.10 - 7.31	0.035	3.98	0.023	0.88 - 5.22
Hsa-miR-183	2.42	0.73 - 4.97	0.023	4.50	0.042	0.76 - 6.14
Hsa-miR-370	2.53	1.02 - 4.31	0.011	3.79	0.031	1.75 - 5.62
† - Interval de confidență; P – indicele de semnificație statistică;						

Corelarea expresiei genelor miARN/ARNm în raport cu variabilele clinicopatologice

Relevanța clinică a genelor miARN, respectiv ARNm selectate a fost examinată în raport cu variabilele clinice și patologice la pacienții cu CCR. Astfel, în ceea ce privește vârsta, sexul, dimensiunea tumorii, gradul diferențierii tumorale, localizare tumorii primare sau statusul instabilității microsatelitare, nu a fost evidențiată o asociere semnificativă statistic (Tabel 3).

În ceea ce privește gradul diferențierii tumorale (stadiul G) o asociere semnificativ statistică a fost observată cu expresia genei miR-30c, reprezentată grafic în figura 4A ($P = 0.02$).

De asemenea, testele non-parametrice Kruskal-Wallis și Mann-Whitney au indicat o tendință de asociere semnificativă între expresia genelor miARN: miR-183, miR-182, miR-141, miR-143, miR-145, miR-30c, miR-370, miR-144 și miR-21 și genelor ARNm: PTEN și TP53 cu unele variabilele clinicopatologice. Astfel, referitor la profunzimea invaziei tumorale, am observat o asociere statistică cu expresia crescută a genelor miR-182 ($P < 0.001$), miR-183 ($P < 0.001$), miR-21 ($P < 0.001$) și miR-370 ($P = 0.04$), reprezentate grafic în figura 4B și respectiv cu expresia scăzută a miR-143 ($P = 0.01$), miR-145 ($P = 0.04$) și miR-144 ($P = 0.04$), grafic reprezentate în figura 4C. De asemenea, expresia scăzută a genelor PTEN ($P < 0.001$) și TP53 ($P < 0.001$) s-a corelat semnificativ statistic cu stadiul invaziei tumorale, figura 4D.

Referitor la implicarea ganglionilor limfatici, stadializarea pN s-a corelat statistic semnificativ cu expresia crescută a genelor miR-182 ($P = 0.003$), miR-183 ($P = 0.03$), miR-21 ($P = 0.004$) și miR-370 ($P = 0.03$), figura 4E, respectiv cu expresia scăzută a genelor miR-143 ($P = 0.03$), miR-145 ($P < 0.001$) și TP53 ($P = 0.003$), grafic reprezentate în figura 4F.

Extensia leziunii primare a prezentat valori mai mari pentru expresia genelor miR-182 ($P < 0.001$), miR-183 ($P < 0.001$), miR-141 ($P < 0.001$) și miR-370 ($P < 0.001$), figura 4G, și respectiv valori mai mici pentru expresia redusă a miR-143 ($P < 0.001$), miR-145 ($P < 0.001$), miR-144 ($P < 0.001$) și miR-375 ($P < 0.001$), figura 4H.

Nu în cele din urmă, au fost stabilite asocierile cauzale între expresia miARN-urile diferențiate și expresia genele ARNm. Astfel, folosind analiza Spearman am observat că nivelul expresiei genei PTEN s-a corelat semnificativ negativ cu expresia genei miR-21 ($\rho = -0.34$; $P = 0.02$), iar expresia scăzută a genei TP53 s-a corelat invers cu nivelul crescut al genei miR-21 ($\rho = -0.49$; $P = 0.001$).

Tabel 3. Parametri clinicopatologici ai pacienților cu CCR înrolați în studiu ([§]Mann-Whitney; [†]Kruskal-Wallis; *P < 0.05, **P< 0.0)

Specii	Variabile					Stadializarea TNM			
	Vârsta [§]	Sex [§]	Localizare	Diametru [§]	Grading [†]	pT [†]	pN [†]	pM [§]	MSI [§]
miARN	≤ 65 (26.2%) >65 (71.4%)	Masculin (48.8%) Feminin (51.2%)	Proximal (36.5%) Distal (26.8%) Rect (34.1%)	≥ 5 (53.6%) < 5 (46.3%)	G1 (21.9%) G2 (73.1%) G3 (4.8%)	T2 (14.6%) T3 (41.4%) T4 (43.9%)	N0 (39.0%) N1 (29.2%) N2 (31.7%)	M0 (63.4%) M1 (36.5%)	MSI S (80.7%) MSI I (12.1%)
miR-30c	0.43-0.93; P = 0.66	0.43-0.93; P = 0.60	19.69-22.43-21.09; P = 0.82	0.43-0.93; P = 0.47	30.33-20.93-10.20; P = 0.02*	21.67-22.47-19.39; P = 0.47	23.0-22.0-17.62; P = 0.45	0.43-0.93; P = 0.51	0.43-0.93; P = 0.0616
miR-375	0.10-0.91; P = 0.89	0.10-0.91; P = 0.79	21.31-19.21-22.82; P = 0.75	0.10-0.91; P = 0.42	20.83-20.0726.80; P = 0.50	15.33-21.06-22.83; P = 0.41	20-21.67-21.62; P = 0.91	0.10-0.91; P < 0.001**	0.10-0.91; P = 0.07
miR-195	0.22-0.71; P = 0.77	0.22-0.71; P = 0.71	21.69-22.07-18.64; P = 0.74	0.22-0.71; P = 0.51	20.17-22.27-14.40; P = 0.39	25.50-22.53-18.06; P = 0.33	24.25-19.42-18.46; P = 0.37	0.22-0.71; P = 0.87	0.22-0.71; P = 0.17
miR-144	0.35-1.12; P = 0.51	0.35-1.12; P = 0.55	23.12-17.36-22.55; P = 0.37	0.35-1.12; P = 0.45	18.83-20.50-26.60; P = 0.51	31.33-17.0-21.33; P = 0.04	25.94-16.08-19.46; P = 0.08	0.35-1.12; P < 0.001**	0.35-1.12; P = 0.10
miR-214	0.46 -0.14; P = 0.64	0.46 -0.14; P = 0.66	17.75-23.00-23.18; P = 0.38	0.46 -0.14; P = 0.26	24.83-20.83-17.40; P = 0.58	27.33-23.00-17.00; P = 0.12	25.19-16.08-20.38; P = 0.13	0.46 -0.14; P = 0.64	0.46 -0.14; P = 0.44
miR-299	0.21-0.83; P = 0.92	0.21-0.83; P = 0.42	17.94-20.17-19.33; P = 0.86	0.21-0.83; P = 0.32	16.0-19.07-23.00; P = 0.60	24.80-20.56-15.63; P = 0.18	23.50-11.45-20.67; P = 0.12	0.41-1.29; P = 0.79	0.41-1.29; P = 0.07
miR-143	0.19-0.66; P = 0.51	0.19-0.66; P = 0.50	15.81-24.00-24.73; P = 0.84	0.19-0.66; P = 0.10	26.50-20.23-19.00; P = 0.46	28.67-24.4715.17; P = 0.01*	25.31-22.83-14.0; P = 0.03*	0.21-0.83; P < 0.001**	0.21-0.83; P = 0.30
miR-145	0.19-0.66; P = 0.61	0.19-0.66; P = 0.67	18.00-21.93-24.18; P = 0.39	0.19-0.66; P = 0.27	25.67-21.17-14.40; P = 0.29	26.67-24.41-15.89; P = 0.04*	24.06-26-12.62; P < 0.001**	0.19-0.66; P < 0.001**	0.19-0.66; P = 0.40
miR-21	2.13-6.12; P = 0.67	2.13-6.12; P = 0.61	20.37-21.14-20.45; P = 0.90	2.13-6.12; P = 0.11	15.83-20.97-27.40; P = 0.28	9.33-17.35-28.33; P < 0.001**	15.80-18.17-30; P = 0.004**	2.13-6.12; P < 0.001**	2.13-6.12; P = 0.08
miR-141	1.03-1.83; P = 0.34	1.03-1.83; P = 0.74	24.25-17.00-21.36; P = 0.25	1.03-1.83; P = 0.54	26.33-19.17-25.60; P = 0.26	17.50-19.59-23.50; P = 0.46	18.44-22.92-22.38; P = 0.54	1.03-1.83; P = 0.34	1.03-1.83; P = 0.34
miR-182	1.90-7.09; P = 0.58	1.90-7.09; P = 0.68	20.88-17.86-25.18; P = 0.31	1.90-7.09; P = 0.48	20.50-21.07-21.20; P = 0.99	7.33-16.82-29.50; P < 0.001**	13.69-22.83-28.31; P = 0.003**	1.90-7.09; P < 0.001**	1.90-7.09; P = 0.37
miR-183	1.19-7.48; P = 0.88	1.19-7.48; P = 0.98	19.81-19.32-24.86; P = 0.45	1.19-7.48; P = 0.58	22.92-19.73-26.30; P = 0.47	6.58-20.29-26.47; P < 0.001**	16.22-20.25-27.58; P = 0.03*	1.19-7.48; P < 0.001**	1.19-7.48; P = 0.06
miR-370	1.37-6.04; P = 0.82	1.37-6.04; P = 0.81	16.62-23.07-24.73; P = 0.16	1.37-6.04; P = 0.18	18.17-21.40-22.00; P = 0.81	13.83-18.24-26.0; P = 0.04*	18-17.33-28.08; P = 0.03*	1.37-6.04; P < 0.001**	1.37-6.04; P = 0.70

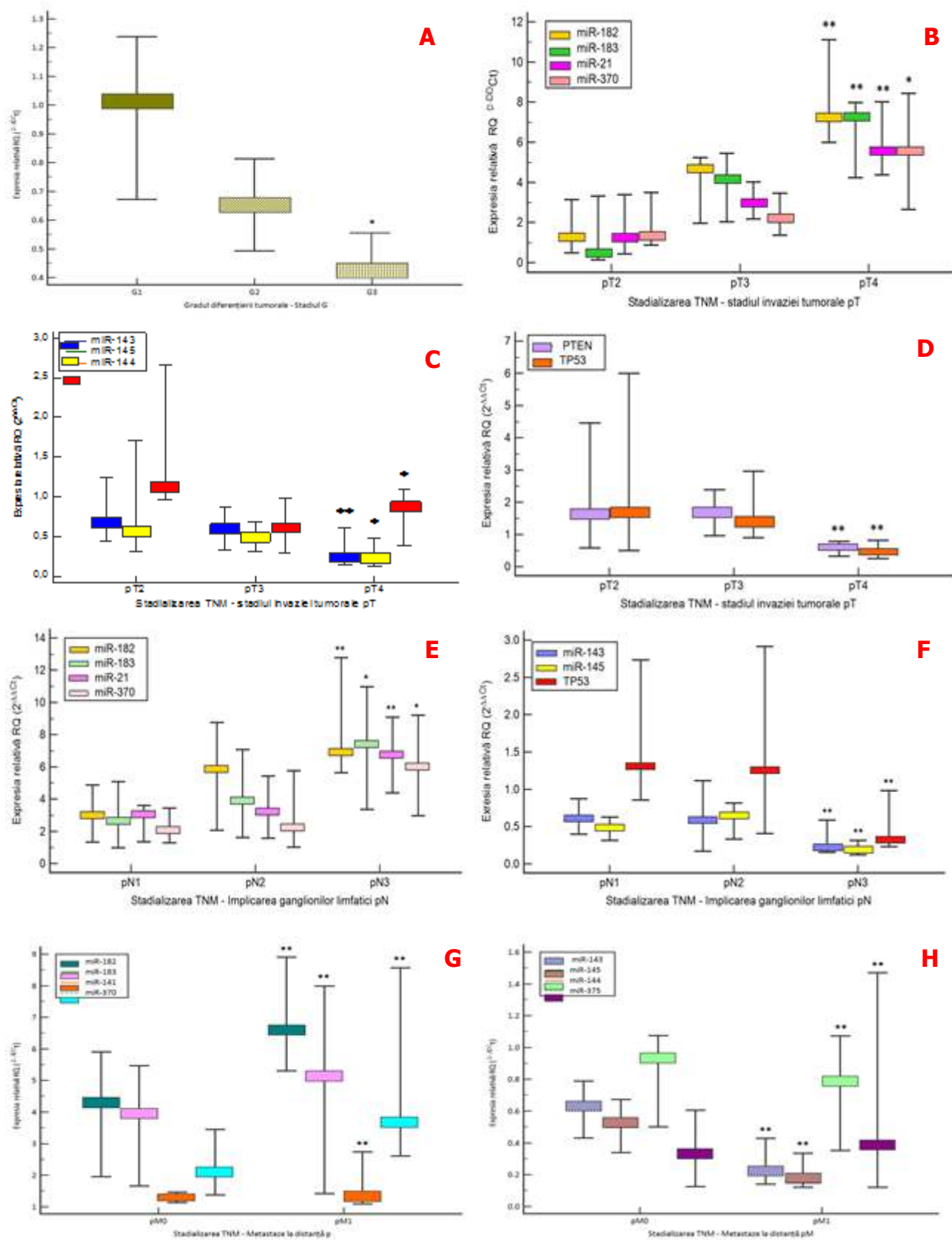


Figura 4. Expresia relativă a speciilor de miARN/ARNm selectate în funcție de diferite etape clinicopatologice.

Discuții

Relația de interdependență dintre dezechilibrele apărute la nivel molecular și progresia tumorală postulate de Vogelstein și Fearon în 1990 a reprezentat timp de două decenii paradigma evenimentelor genetice și epigenetice întâlnite în cancerul colorectal, constituind un exemplu de evoluție fiziopatologică pentru multe alte tipuri de cancere (9). Acest model este considerat azi mult prea simplist în lumina studiilor recente care sugerează că peste 90% din genomul uman este transcris dinamic și persuasiv în alte specii de ARN decât ARNm, denumite în continuare ARN-uri necodante (19).

Prin coordonarea unei pleiade de gene implicate în diferite căi de semnalizare celulară, speciile de miARN dictează în mod consecvent reglarea transcripțională și post-transcripțională a expresiei genice, vizând mai multe oncogene sau gene supresoare tumorale critice în patogeneza cancerului colorectal. Pe acest fundal s-a constatat că diferite specii de miARN-uri sunt dereglate în țesutul tumoral comparativ cu mucoasa normală, unde miARN-urile supraexprimate acționează ca oncogene și sunt denumite "oncomiR-uri", în timp ce miARN-urile subexprimate acționează ca gene supresoare tumorale și sunt denumite "tsmiR-uri" (20). Astfel se poate concluziona că modificările pleiotropice ale transcriptomului sunt o caracteristică universală a celulelor canceroase.

În conformitate cu cele afirmate mai sus în lucrarea de față am demonstrat că profilul expresie moleculelor de miARN, respectiv ARNm a fost modificat sistematic semnificativ în grupul selectat de pacienți români cu CCR. Acest lucru a fost realizat folosind metoda qRT-PCR în două etape utilizând sonde de hidroliză specifice miARN/ARNm TaqMan®MGB. Lotul de studiu a cuprins un număr de 41 de pacienți diagnosticați și confirmați histopatologic cu adenocarcinom de colon sau rect de la care s-au recoltat imediat după intervenția chirurgicală două fragmente de țesut, respectiv un eșantion din componenta tumorală și unul din mucoasa adiacentă normală (situat la > 5 cm de țesutul tumoral).

Cuantificarea și explorarea semnificației clinice s-a realizat pe un panel de 14 gene miARN (miR-30c, -375, -195, -144, -214, -143, -145, -299, -21, -182, -183, -370 și -21) și 5 gene ARNm (PTEN, MSH6, PIK3CA, mTOR și TP53), gene selectate pe baza revizuirii cuprinzătoare a literaturii, a datelor publicate anterior și a prin consultarea bazelor de date Sanger Center Registry și miRBase.

În ceea ce privește genele miARN, 13 au fost dereglate în mod semnificativ statistic în CCR comparativ cu NOR, din care 5 miARN-uri au fost supraexprimate și 8 subexprimate. Grupul miARN-urilor supraexprimate este constituit din miR-141, -182, -183, -370 și -21. În contrast, miARN-urile subexprimate sunt reprezentate de speciile miR-30c, -144, -375, -214, -299, -195, -143 și -145. Supraexpresia miR-182, -183, -370 și subexpresia miR-30c, -375 și -195 au prezentat cele mai evidente diferențe statistice, un singur miARN nu a relevat nicio diferență statistică între cele două eșantioane, respectiv miR-299. Referitor la expresia genelor ARNm, acestea sunt exprimate statistic diferențiat în CCR în comparație cu NOR, cu 3 gene subexprimate (MSH6, TP53 și PTEN) și 2 supraexprimate (mTOR și PIK3CA). Toate aceste descoperiri sunt în conformitate cu studiile anterioare, sugerând faptul că expresia anormală a genelor miARN mature analizate este pivotantă în adenocarcinomul colorectal, iar expresia lor fiind influențată în mod direct de micromediul celular (21-26).

Deoarece expresia inadecvată a miARN-urilor participă în mod activ și constant la dezvoltarea cancerului colorectal prin modificarea nivelului transcripției genelor oncogene sau supresoare tumorale, acestea ar putea fi de asemenea implicate și în evoluția CCR.

Astfel, în această teză am demonstrat că expresia diferențiată a miARN-urilor analizate se corelează cu diferite variabile clinice și histologice, cum ar fi gradul diferențierii, stadiul invaziei tumorale, prezența metastazelor ganglionare locoregionale sau apariția metastazelor la distanță. În acest sens, testele non-parametrice au indicat o tendință de asociere semnificativă statistic între gradul invaziei tumorale și expresia crescută a genelor miR-182, miR-183, miR-21, miR-370 și respectiv cu expresia scăzută a miR-143, miR-145, miR-144, PTEN și TP53. Mai mult, am observat o tendință de creștere a expresiei genelor miR-182, miR-183, miR-21, miR-370 și respectiv o scădere a expresiei genelor miR-143, miR-145 și TP53, expresii ce se asociază semnificativ cu implicarea ganglionilor limfatici loco-regionali.

Referitor la stadiul extensia leziunii primare, aceasta a prezentat valori mai mari pentru expresia genelor: miR-182, miR-183, miR-141 și miR-370, și respectiv valori mai mici pentru expresia: miR-143, miR-145, miR-144 și miR-375. Toate aceste constatări sunt în concordanță cu studiile publicate anterior, sugerând faptul că miARN-urile studiate prezintă același model de expresie în rândul pacienților români, expresia lor nefiind influențată de caracteristicile genetice, respectiv epigenetice unice populaționale sau de factorii socio-economici asociați fiecărei regiuni (25-28).

Analiza de funcționare a receptorului (ROC) și regresia logistică univariată și multivariată au fost utilizate pentru a determina fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN selectate de a funcționa ca biomarkeri tisulari în CCR. Astfel am demonstrat că miR-182, -183, -21, -143, -145, -195 și -375 pot servi ca potențiali biomarkeri tisulari utili în diferențierea eșantioanelor tumorale de non-tumorale cu o sensibilitate cuprinsă între 87.80 – 60.98% și o specificitate cuprinsă între 92.68 – 78.05%, iar analiza uni și multivariată a indicat faptul că nivelul de expresie ale genelor miR-30c, miR-144, miR-375, miR-214, miR-21, miR-195, miR-141, miR-182, miR-183, miR-370, metastazele îndepărtate invazia și dimensiunea tumorii reprezintă factori prognostici predictivi independenți și importanți asociați în rândul pacienților cu CCR.

Deși nivelul de expresie nu a fost determinat și în sânge, am identificat o listă cuprinzătoare de gene cu modele de expresie extrem de diferențiate în adenocarcinomul colorectal, gene ce ar putea servi ca potențiali markeri moleculari complementari factorilor histopatologici diagnostici existenți.

Concluzii finale

Rezultatele tezei au demonstrat că expresia sistematic modificată a miARN-uri analizate prezintă potențiale implicații în etiologia și patogeniza pacienților cu CCR din partea de sud-est a României. De asemenea, dereglarea expresiei acestor miARN-uri variază în diferite stadii ale dezvoltării CCR și pot servi ca potențiali biomarkeri tisulari de predicție și progresie în CCR. Mai mult, observațiile tezei de doctorat întăresc studiile anterioare și oferă o justificare în aplicarea cunoștințelor de histopatologie moleculară în CCR.

În concluzie, valoarea diagnostică a panelului de gene miARN și ARNm studiate are un impact major asupra preciziei diagnosticului pacienților români cu adenocarcinom colorectal, dar nu sunt încă în măsură să concureze cu efectuarea altor teste de rutină, ci oferă perspective promițătoare și deschide noi oportunități de îmbunătățire a diagnosticului.

1. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* 2006 Aug;66(15):7390-7394.
2. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-114.
3. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0. 2012.
4. World Health Organization - Cancer Country Profiles 2014, Romania, http://www.who.int/cancer/country-profiles/rou_en.pdf?ua=1.
5. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;25(1):16-25.
6. Jessup JM, Goldberg RM, Aware EA, et al. Colon and Rectum. In *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th, Amin MB (Ed). AJCC Chicago 2017; p.251.
7. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest.* 2012 Sep;3(3):153-173.
8. Edge S, Byrd D, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Ed. New York, Dordrecht, Heidelberg, London; 2010. 143-164 p. <http://www.uicc.org/resources/tnm>.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun;61(5):759-767.
10. Pikor L, Thu K, Vucic E, Lam W. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3-4):341–352.
11. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun;363(6429):558–61.
12. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9(7): 489-499.
13. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encode small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec; 75(5):843-854.

14. Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep;21(17):4663-4670.
15. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007 Jul;27(1):91-105.
16. Faculty of Life Sciences, University of Manchester. miRBase 20: the miRNA database. <http://www.mirbase.org> (released Jun 2017).
17. Ma L, Weinberg RA. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 2008 Sep;24(9):448-456.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Methods*. 2001 Dec; 25:402-408.
19. Faculty of Life Sciences, University of Manchester. miRBase 20: the miRNA database. <http://www.mirbase.org> (released Jun 2017).
20. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-269.
21. Liu B, Meng Z, Liu LZ, et al. Down-regulation of miRNA-30c predicts poor prognosis in Colorectal Cancer patients. *Revista Română de Medicină de Laborator*. 2016 Dec; 24(4): 2284-5623.
22. Wang Y, Tang Q, Li M, Jiang S, Wang X. MicroRNA-375 inhibits colorectal cancer growth by targeting PIK3CA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb; 444(2):199-204.
23. Liu L, Chen L, Xu Y, Li R, Du X. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep; 400(2):236–240.
24. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct;1 (12):882-891.
25. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008 Jan; 299(4):425–436.
26. S. Dambal, M. Shah, B. Mihelich, L. Nonn. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Res*. 2015 Sep; 43(15):7173–7188.

27. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A micro-RNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Feb;103(7):2257-61.
28. Ding L, Yu LL, Han N, Zhang BT. miR-141 promotes colon cancer cell proliferation by inhibiting MAP2K4. *Oncol Lett*. 2017 Mar; 13(3):1665-1671.

Articole științifice publicate in extenso

- **Costel Brînzan**, Mariana Așchie, Elena Matei, Anca Mitroi, Georgeta Cozaru. *Molecular expression profiles of selected microRNAs in colorectal adenocarcinoma in patients from south-eastern part of Romania*. Medicine 2019 Nov;98(47):e18122. doi:10.1097/MD.00000000000018122.(https://journals.lww.com/mdjournal/FullText/2019/11220/Molecular_expression_profiles_of_selected.84.aspx).
- **Costel Brînzan**, Mariana Așchie, Cătălin Nicolae Grasa, Anca Mitroi, Elena Matei, Georgeta Cozaru. *The mutation profiles of KRAS and BRAF genes in Romanian colorectal cancer cohort*. Rev.Chim 2019;70(4):1346-1350.
(<https://revistadechimie.ro/Articles.asp?ID=7124>)
- **Costel Brînzan**, Mariana, Așchie, Georgeta Cozaru, Eugen Dumitru, Anca Mitroi. *The diagnostic value of miR-92a, -143 and -145 expression levels in patients with colorectal adenocarcinoma from Romania*. Medicine 2020 Aug;99(35):e21895. doi:10.1097/MD.00000000000021895.(https://journals.lww.com/mdjournal/Fulltext/2020/08280/The_diagnostic_value_of_miR_92a,_143,_and_145.63.aspx)

Lucrări comunicate și publicate în rezumat în volumele unor manifestări științifice internaționale/naționale

- **Costel Brînzan**, Mariana Așchie, Georgeta Cozaru, Elena Matei, Anca Mitroi. *Expression patterns of miR-143, -145 and -92a in colorectal cancer from south-east Romanian patients*. The 11th National Congress with international participation of the Romanian Society of Cell Biology 2019 Jun.
- M Așchie, I Poinareanu, GC Cozaru, AF Mitroi, **C Brînzan**, D Așchie, GI Baltatescu, M Enciu, AA Nicolau, A Chisoi, O Cojocaru, *Genotyping-RAS mutations analysis in colorectal cancer*, VIRCHOWS ARCHIV, SPRINGER, S198-S198, volum 471, 2017/9/1, IF = 2,848.

- M Așchie, GC Cozaru, AF Mitroi, **C Brînzan**, *Colorectal adenocarcinomas and miRNA expression profiles*, VIRCHOWS ARCHIV (2018), SPRINGER, S198-S198, volum 473 (Suppl 1): S 293, IF = 2,936.
- Așchie Mariana, Mitroi Anca, **Brînzan Costel**, Cozaru, Georgeta, *Differentially expressed miRNAs in hepatocellular carcinomas*, The XXXII Congres of the International Academy of Pathology, 14-18 octombrie 2018, Iordan.
- Așchie Mariana, Cozaru Georgeta Camelia, Mitroi Anca Florentina, **Brînzan Costel**, *Screeningul mutațiilor RAS în cancerul colorectal*, Conferința Științifică a Academiei Oamenilor de Știință din România, 30 martie 2018, București, ISSN 2601 – 5102.
- Mariana Așchie, Mariana Deacu, Mădălina Boșoteanu, Anca Mitroi, **Costel Brînzan**, Anita Cristina Mitu, Georgeta Camelia Cozaru, *Profilele de expresie ale microRNA în adenocarcinomul colorectal*, Conferința Științifică a Academiei Oamenilor de Știință din România, iunie 2020, București.