

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Autofagia în cancerul colorectal

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. FRANCISC MIXICH

STUDENT-DOCTORAND:
USCATU CONSTANTIN DANIEL

CRAIOVA
2016

CUPRINS

STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul I: Epidemiologia cancerului colorectal

Capitolul II: Autofagia

Capitolul III: Rolul autofagiei în cancer

Capitolul IV: Principalele gene ale autofagiei implicate în cancerul colorectal

Capitolul V: Medicația autofagică în cancerul colorectal

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul VI: Obiective urmărite

Capitolul VII: Material și metode

Capitolul VIII: Expresia LC3 în cancerul colorectal

Capitolul IX: Expresia genelor LC3, BECN1 ȘI BCL2 în cancerul colorectal

Capitolul X: Relația dintre autofagie și neovascularizație în cancerul colorectal

Capitolul X: CONCLUZII FINALE

Bibliografie

CUVINTE CHEIE

- Cancer colorectal
- Autofagie
- LC3
- BECN1
- BCL 2
- CD 34
- CD 31
- CD 105

STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul I: Epidemiologia cancerului colorectal

Cancerul colorectal este al treilea cel mai frecvent tip de cancer la nivel global în rândul bărbaților și al doilea în rândul femeilor, însumând circa 10% din incidența globală a cancerelor (1-3). Din punct de vedere al mortalității, cancerul colorectal ocupă locul patru la nivel global (2).

În România mortalitatea cancerului colorectal s-au dublat în ultimele două decenii, în prezent CCR fiind a doua cauză de deces de origine neoplazică după cancerul pulmonar (4). Actual, Ministerul Sănătății estimează incidența CCR la 10,1 cazuri noi la 100000 de bărbați și 7,3 cazuri noi la 100000 de femei (5).

Capitolul II: Autofagia

Autofagia (din greacă "auto"=propriu și "phagein"= a mânca (6)) este un mecanism catabolic bazal, caracterizat de autodigestie celulară, îndepărtarea componentelor celulare (cum ar fi organitele și proteinele) îmbătrânite sau degradate și a reziduurilor toxice provenite din metabolismul celular, realizat prin acțiunea lizozomilor (7,8). Autofagia (sau autofagocitoza) este un proces fiziologic ce apare în celulele normale la un nivel bazal, asigurând homeostazia sau supraviețuirea celulei în condiții speciale, prin degradarea și reciclarea compușilor celulari (8). Hipoxia, stresul oxidativ și deprivarea de nutrienți se numără printre condițiile speciale care declanșează autofagia, fapt ce asigură supraviețuirea celulei (9).

Capitolul III: Rolul autofagiei în cancer

Ipoteza actual acceptată prezintă autofagia ca având un rol dual, contradictoriu în carcinogeneză. Mai întâi autofagia este un mecanism de supraveghere în celulele normale, protejându-le pe acestea de transformarea malignă prin îndepărtarea organitelor și proteinelor deteriorate, și prin reducerea deteriorării ADN-ului, a cantității de specii reactive ale oxigenului și a mitocondriilor anormale. Cu toate acestea, autofagia poate să susțină formarea celulelor maligne prin oferirea de nutrienți necesari creșterii celulelor maligne în condiții de hipoxie și prin inhibarea morții celulare și creșterea rezistenței la tratament (10,11).

Răspunsul celulelor maligne la autofagie în timpul metastazării este diferit în funcție de stadiul de evoluție. Autofagia poate ajuta la reducerea metastazelor în primele etape ale diseminării celulelor maligne, prin promovarea răspunsului imun inflamator împotriva tumorii. În plus, autofagia limitează necroza tumorală și expansiunea celulelor maligne dormante (ce duc la formarea de micrometastaze), și în același timp afectează senescenta produsă de oncogene (12). Autofagia pare să susțină formarea metastazelor în stadii avansate ale cancerului, prin creșterea ratei de supraviețuire a celulelor maligne detașate din tumora primară (lucru posibil și datorită lipsei matricei extracelulare) și prin susținerea diseminării celulelor maligne în situsuri aflate la distanță de tumora primară, datorate trecerii celulelor tumorale (cărora le lipsesc factorii de conexiune cu matricea extracelulară) într-un stadiu dormant până la apariția condițiilor propice pentru creșterea și diviziunea celulară (12,13).

Capitolul IV: Principalele gene ale autofagiei implicate în cancerul colorectal

➤ LC3/LC3-II:

- supraexpresie în stadiile avansate (14);
- supraexpresia este asociată cu agresivitatea (15);
- supraexpresie perinucleară asociată cu un pronostic pozitiv (16);
- niveluri crescute în DLD-1 și SW480 (linii celulare de CCR) tratate cu inhibitori ai autofagiei (17);
- niveluri crescute în liniile celulare de CCR tratate cu 5-fluorouracil (18);
- niveluri crescute în liniile celulare de CCR tratate cu 5-fluorouracil și radiotratate (19);
- niveluri scăzute asociate cu un pronostic bun și răspuns la tratament (20,21);
- lipsa expresiei asociată cu un pronostic nefavorabil și o supraviețuire scăzută (22).

➤ BECN1/Beclin1:

- supraexpresia este invers proporțională cu metastazarea (23);
- supraexpresia este asociată cu un pronostic bun (24);

- supraexpresia este asociată cu creșterea supraviețuirii la pacienții tratați cu 5-fluorouracil (25);
 - niveluri scăzute asociate cu o supraviețuire crescută în stadii avansate la pacienții tratați cu cetuximab (20,21);
 - niveluri scăzute asociate cu o supraviețuire scăzută și un pronostic nefavorabil (22);
 - niveluri scăzute asociate cu invazia limfo-vasculară (26).
- BCL2/Bcl2:
- niveluri crescute asociate cu metastazarea și invazia (27);
 - niveluri crescute asociate cu rezistența la paclitaxel (28).

Capitolul V: Medicația autofagică în cancerul colorectal

Inhibitorii autofagiei pot exercita efecte antineoplazice, de exemplu: suprimarea efectului protector al autofagiei prin tratarea cu 3-metil adenină a fost raportată că potențează eficacitatea terapeutică a cisplatinului și 5-FU în cancerele digestive, inclusiv în cancerul de colon (29).

Modulatorii autofagiei pot deveni o țintă pentru creșterea eficacității terapiei antineoplazice, fie singuri sau combinați cu alte chimioterapice (30).

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul VI: Obiective urmărite

Scopul principal este reprezentat de găsirea unei potențiale noi ținte terapeutice prin studierea unor genelor cheie implicate în autofagie (LC3, BECN1 și BCL2), urmărindu-se, totodată, posibila asociere cu alte ținte deja folosite în terapia cancerului colorectal. Obiective:

- evaluarea rolului autofagiei: promotor sau supresor tumoral prin studierea nivelului de expresie al LC3 la nivelul tumorii primare;
- evaluarea expresiei genelor BECN1 și BCL-2 pentru a observa influența acestora asupra modului de reglare al autofagiei la nivelul tumorii primare comparativ cu țesutul normal și rolul lor în dezvoltarea tumorii;
- evaluarea vascularizației la nivel tumoral comparativ cu cel din mucoasa colorectală normală.

Capitolul VII: Material și metode

Materialul a fost recoltat de la pacienții diagnosticați și operați pentru cancer colorectal, fiind prelevate două probe: una de la nivelul formațiunii tumorale maligne și cealaltă din țesutul normal.

S-au folosit trei metode diferite de evaluare a expresiei genice și proteice a țintelor de interes (Imunohistochimie, Western Blot și Real Time PCR) în vederea atingerii obiectivelor propuse.

Capitolul VIII: Expresia LC3 în cancerul colorectal

Expresia proteinei LC3 pe secțiuni la parafină obținute din țesut normal și tumoral a relevat o supraexpresie înalt semnificativă a LC3 la nivelul țesutului tumoral ($p < 0,001$ pentru testul t Student) spre deosebire de cel normal (care a fost considerat ca nivel de referință pentru expresia LC3), cu o medie a valorii LC3 mai mare în tumoră comparativ cu media din țesutul sănătos. De asemenea, testul de corelație Pearson a arătat faptul că nivelurile de LC3 din țesutul normal și din cel tumoral sunt într-o corelație directă ($p < 0,001$), cu cât nivelul de LC3 este mai mare în epiteliul normal, cu atât va fi mai mare și în cel malign. Acest lucru conduce la concluzia că nivelul de expresia a proteinei LC3 este reglat genetic în celulele normale, variind de la individ la individ, și este up-reglat în celulele maligne.

Evaluarea cantitativă a proteinei LC3 prin tehnica Western Blot a constatat un nivel crescut de expresie pentru izoforma LC3-II (considerată marker pentru autofagie) în țesutul tumoral comparativ cu cel normal, testul t Student corectat cu factorul Wilcoxon fiind semnificativ ($p < 0,05$); mediile expresiei LC3-II au fost de 0,107 g/μl în țesutul normal și de 0,504 g/μl în cel tumoral. Autofagia este up-reglată în țesutul malign, participând activ în procesul carcinogenic, spre deosebire de țesutul sănătos în care autofagia este reglată la nivelul bazal asigurând funcționarea în condiții optime a acestuia.

Evaluarea expresiei genei MAP1LC3 nu a găsit nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între media valorilor de expresie ale genei LC3 pentru țesutul normal (0,484) și media pentru țesutul tumoral (0,770), cu o valoare a coeficientului p al testului t Student de 0,283.

Capitolul IX: Expresia genelor LC3, BECN1 ȘI BCL2 în cancerul colorectal

La compararea nivelelor de expresie a genelor LC3 și BECN1 s-a obținut o medie de 1,164 (cu o deviație standard de 1,461) pentru LC3 și de 0,9286 (cu deviația standard de 0,6774) pentru BECN1, rezultând o diferență ne semnificativă statistic (testul t Student - $p = 0,5304$), fapt ce susține afirmația potrivit căreia autofagia este up-reglată la nivelul țesutului malign colorectal, aici BECN1 fiind supraexprimată comparativ cu țesutul normal, spre deosebire de BCL2 care este supraexprimată în țesutul normal. La compararea nivelelor de expresie dintre BECN1 și BCL2 s-a obținut o medie de 1,047 (cu o deviație standard de 0,9857) pentru BECN1 și de 0,8638 (cu deviația standard de 1,753) pentru BCL2, testul t Student, corectat cu factorul Wilcoxon pentru distribuția gaussiană a datelor, a fost înalt semnificativ ($p < 0.0001$), fapt ce arată un efect promotor al procesului autofagic la nivelul țesutului malign comparativ cu cel normal, efect care pare să joace un rol important în susținerea carcinogenezei.

Capitolul X: Relația dintre autofagie și neovascularizație în cancerul colorectal

Marcarea imunohistochimică a secțiunilor provenite din zona tumorală a arătat o medie a vaselor marcate cu CD34 și CD31 mai mare la nivelul bazei tumorale comparativ cu suprafața tumorii, și o medie a vaselor marcate cu CD105 mai mare la nivelul suprafeței tumorii comparativ cu baza tumorii. Diferența dintre mediile rezultatelor obținute a fost înalt semnificativă ($p < 0.0001$) la aplicarea testului ANOVA.

Vasele de neoformație marcate cu CD105 au fost comparate cu evaluarea cantitativa a LC3 pe aceleași zone, urmărindu-se corelația acestora. Testul de corelație Spearman ($p = 0,9588$) nu a arătat existența nici unei relații între neovascularizație și procesul de autofagie, numărul de vase de neoformație fiind crescut atât la cazurile cu un procent ridicat de LC3, cât și la cazurile cu un procent scăzut, neexistând nici un trend (ascendent sau descendent) al corelației.

Observația de mai sus aduce un argument important asupra posibilității de a combina terapia anti-autofagie cu terapia anti-angiogenică, cele două tipuri de terapii

țintind mecanisme diferite, cu rol în carcinogeneză, care nu par să se influențeze reciproc.

Capitolul X: CONCLUZII FINALE

1. Rezultatele obținute în acest studiu arată o augmentare a procesului autofagic în țesutul colorectal malign comparativ cu cel normal.
2. BECN1, gena promotoare a procesului autofagic, este supraexprimată în țesutul tumoral comparativ cu BCL2, gena inhibitoare a procesului autofagic, rezultatele indicând faptul că progresia autofagiei favorizează carcinogeneza.
3. Neovascularizația tumorală, evaluată cu ajutorul marker-ului CD105, nu se corelează cu procesul autofagic, cele două mecanisme neinfluențându-se reciproc.
4. Rezultatele noastre susțin faptul că procesul autofagic poate fi o nouă țintă terapeutică pentru cancerul colorectal, terapia anti-autofagie singură sau în combinație cu terapia anti-angiogenică reprezentând o opțiune pentru viitorul tratament împotriva cancerului colorectal.

Bibliografie

1. BERNARD W. STEWART CPW: **World Cancer Report 2014**, vol. 1, 2014 edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
2. **World Health Organization** [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>]
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians** 2011, **61**(2):69-90.
4. Ait Ouakrim D, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E, Bota M, Jenkins MA, Bleiberg H, Autier P: **Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. BMJ** 2015, **351**:h4970.
5. **Ministerul Sănătății** [www.ms.ro/documente/1216%20Anexa%208720_6579.doc]
6. **Autophagy** [<https://en.wikipedia.org/wiki/Autophagy>]
7. Levine B, Kroemer G: **Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Cell** 2008, **132**(1):27-42.
8. Lin N-Y, Beyer C, Gießl A, Kireva T, Scholtyssek C, Uderhardt S, Munoz LE, Dees C, Distler A, Wirtz S *et al*: **Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases** 2012, **72**(5):761-768.
9. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: **Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature** 2008, **451**(7182):1069-1075.
10. Panda PK, Mukhopadhyay S, Das DN, Sinha N, Naik PP, Bhutia SK: **Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. Seminars in Cell & Developmental Biology** 2015, **39**:43-55.
11. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V *et al*: **Autophagy in malignant transformation and cancer progression. The EMBO Journal** 2015, **34**(7):856-880.
12. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J: **Autophagy and metastasis: another double-edged sword. Current Opinion in Cell Biology** 2010, **22**(2):241-245.

13. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q: **Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis.** *Molecular Cancer* 2015, **14**(1):48.
14. Chen Z, Li Y, Zhang C, Yi H, Wu C, Wang J, Liu Y, Tan J, Wen J: **Downregulation of Beclin1 and Impairment of Autophagy in a Small Population of Colorectal Cancer.** *Dig Dis Sci* 2013, **58**(10):2887-2894.
15. Zheng HY, Zhang XY, Wang XF, Sun BC: **Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus.** *Cancer biology & medicine* 2012, **9**(2):105-110.
16. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Harris AL, Polychronidis A, Gatter KC, Sivridis E: **Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas.** *Journal of Clinical Pathology* 2010, **63**(10):867-872.
17. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H: **Autophagy Is Activated in Colorectal Cancer Cells and Contributes to the Tolerance to Nutrient Deprivation.** *Cancer Research* 2007, **67**(20):9677-9684.
18. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H: **Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model.** *European Journal of Cancer* 2010, **46**(10):1900-1909.
19. Schonewolf CA, Mehta M, Schiff D, Wu H, Haffty BG, Karantza V, Jabbour SK: **Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation.** *World journal of gastrointestinal oncology* 2014, **6**(3):74-82.
20. Guo G-F: **Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer.** *World Journal of Gastroenterology* 2011, **17**(43):4779.
21. Yang M, Zhao H, Guo L, Zhang Q, Zhao L, Bai S, Zhang M, Xu S, Wang F, Wang X *et al*: **Autophagy-based survival prognosis in human colorectal carcinoma.** *Oncotarget* 2015, **6**(9):7084-7103.
22. Choi JH, Cho Y-S, Ko YH, Hong SU, Park JH, Lee MA: **Absence of Autophagy-Related Proteins Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Colorectal Adenocarcinoma.** *Gastroenterology Research and Practice* 2014, **2014**:1-10.
23. Zhang M-Y, Gou W-F, Zhao S, Mao X-Y, Zheng Z-H, Takano Y, Zheng H-C: **Beclin 1 Expression is Closely Linked to Colorectal Carcinogenesis and Distant Metastasis of Colorectal Carcinoma.** *IJMS* 2014, **15**(8):14372-14385.
24. Yang Z, Ghoorun RA, Fan X, Wu P, Bai Y, Li J, Chen H, Wang L, Wang J: **High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer.** *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2015, **39**(1):98-106.
25. Li B-X, Li C-Y, Peng R-Q, Wu X-J, Wang H-Y, Wan D-S, Zhu X-F, Zhang X-S: **The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers.** *Autophagy* 2009, **5**(3):303-306.
26. Zaanani A, Park JM, Tougeron D, Huang S, Wu T-T, Foster NR, Sinicrope FA: **Association of beclin 1 expression with response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal carcinoma.** *International journal of cancer* 2015, **137**(6):1498-1502.
27. Koehler BC, Scherr A-L, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Ellsner C, Welte S, Bermejo JL, Jäger D, Schulze-Bergkamen H: **Beyond Cell Death – Antiapoptotic Bcl-2 Proteins Regulate Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells In Vitro.** *PLoS ONE* 2013, **8**(10):e76446.
28. Wu S, Wang X, Chen J, Chen Y: **Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, **434**(4):898-903.
29. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H: **Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells.** *Ann Surg Oncol* 2009, **16**(3):761-771.
30. Radogna F, Dicato M, Diederich M: **Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target.** *Biochemical Pharmacology* 2015, **94**(1):1-11.