

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

## TEZA DE DOCTORAT

IMPLICAREA POLIMORFISMELOR PRINCIPALELOR ENZIME  
ANTIOXIDANTE IN CANCERUL COLORECTAL

-R E Z U M A T -

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,

PROF. UNIV. DR. SAFTOIU ADRIAN

STUDENT - DOCTORAND,

MACOVEI CRISTINA MARIA (MARGINEAN)

CRAIOVA 2014

## **INTRODUCERE**

Cancerul colorectal este o problemă de sănătate publică, incidența sa fiind în continuă creștere, la acest moment ocupând locul 4 în lume ca frecvență (1; 2).

Etiologia cancerului colorectal nu este pe deplin cunoscută, dar s-a demonstrat originea multifactorială ce cuprinde factori de mediu și factori genetici. Aproximativ 80% dintre cazuri sunt sporadice și apar la persoane fără istoric pozitiv aparent, restul de 20% fiind descris la persoane cu antecedente familiale de cancer colorectal sau polipi colonici .

Înțelegerea mecanismelor celulare și moleculare care controlează procesul tumoral va permite găsirea unor strategii raționale de protecție împotriva mecanismelor patologice prin care acționează bolile neoplazice.

În contextul actual studiul meu își propune evaluarea polimorfismelor principalelor enzime implicate în stresul oxidativ celular care ar putea fi asociate cu riscul de cancer colorectal.

Cuvinte cheie: cancer colorectal, citokine, polimorfism mononucleotidic, genotip, susceptibilitate.

## **I. STADIUL CUNOAȘTERII**

### **CAPITOLUL 1.**

Epidemiologie și factori de risc

În acest capitol se prezintă date recente legate de incidența și prevalența cancerului colorectal, atât la nivel european cât și la nivelul țării noastre.

Cancerul colorectal (CRC) este o cauză majoră de morbiditate și mortalitate, reprezentând în medie 25% din cancerele digestive. Conform unor studii recente, ratele de incidență ale cancerului colorectal la 100000 locuitori variază considerabil la nivel mondial, pentru sexul masculin de la 4,1 % în India la 59% în Cehia, iar la femei de la 3,6% în India până la 39,5% în

Noua Zeelandă. Diferențele de incidență între țări, precum și rata incidenței la emigranți demonstrează că incidența CRC este în mare măsură dependentă de factorii de mediu (3,4).

Tot în acest capitol sunt prezentați factori de risc asociați cu această afecțiune și anume: dieta, obezitatea, fumatul, consumul de alcool, radicalii liberi, susceptibilitatea genetică a gazdei.

## **CAPITOLUL 2**

### **Rolul stresului oxidativ în tumorigeneză**

Radicalii liberi sunt substanțe derivate din compuși incomplet oxidați, care au trecut prin arderi parțiale, având în structura lor grupări de oxigen responsabile de generarea reacțiilor de oxidare la nivelul suprafeței membranei celulare sau în interiorul acesteia(5).

Radicalii liberi cei mai activi sunt: ionii superoxid, peroxid, hidroxid, oxid nitric.Ei provin din două surse majore: endogenă (radicali liberi ce se formează în organism în cursul proceselor fiziologice sau metabolice) și exogenă (radicalii liberi pătrund în organism din mediul exterior) (6).

Radicalii liberi sunt produși înalt reactivi ce determină alterări semnificative în structura moleculelor, respectiv a acizilor nucleici, structurilor lipidice și a structurilor proteice (7).

Reacțiile speciilor reactive de oxigen cu substraturile organice sunt un eveniment complex. ROS reprezintă componente cheie din cadrul căilor de semnalizare, ele determinând inducția sau supresia proliferării celulare, precum și declansarea sau inhibarea apoptozei (8).

Proteinele sunt foarte susceptibile la ROS, fiind ținta frecventă a creșterii producției de radicali liberi. ROS oxidează structurile proteice și inhibă sistemele proteolitice, având ca rezultat alterări ireversibile ale structurilor proteinelor și a funcționalității enzimelor, a capacității ADN polimerazei în replicarea ADN (9). Formarea grupării carbonil este considerată un marker stabil și precoce al oxidării proteice, cu rol esențial în patogeneza unui număr mare de cancere (10;11).

Leziunile ADN induse de stresul oxidativ pot conduce la carcinogeneză, fapt sugerat de creșterea susceptibilității dezvoltării unor neoplazii la pacienți cu diferite afecțiuni inflamatorii ca hepatita virală, colita ulcerativă, infecții parazitare, infecția cu *Helicobacter pylori* (12). În aceste afecțiuni cancerul este indus ca urmare a creșterii nivelului ROS ce determină creșteri ale leziunilor ADN cu potențial mutagen prin activarea oncogenelor sau inactivarea genelor supresor tumorale (13;14). Atât promoția tumorală, cât și progresia tumorală pot fi consecința nivelelor ridicate de ROS endogene. La nivelul celulelor tumorale se regăsesc concentrații ridicate de

ROS, datorită probabil unei rate înalte a metabolismului celular și deficienței în sistemele redox(15,16), caracteristici ce pot contribui și la progresia tumorală.

Există studii care evidențiază faptul că generarea speciilor reactive de oxigen are implicații în toate fazele carcinogenezei - inițiere, promoție și progresie tumorală (17). Evenimentele celulare și moleculare evidențiate în cursul fazelor carcinogenezei includ alterări ale ADN, proliferare crescută și instabilitate genetică(13;18).

În ultimii ani au fost studiate multiple asocieri între stresul oxidativ și cancerul colorectal.

Majoritatea studiilor actuale sunt concentrate asupra investigațiilor factorilor genetici cu rol în susceptibilitatea de a dezvolta cancer colorectal. A fost demonstrat că anumite polimorfisme mononucleotidice (SNPs) ale genelor care codifică enzime implicate în mecanismul de apărare antioxidant se asociază cu o susceptibilitate crescută la cancer. Polimorfismele mononucleotidice joacă un rol important în progresia cancerului colorectal, putând fi considerate potențiali biomarkeri pentru riscul de CRC.

Un amplu studiu caz-control asupra incidenței cancerului colorectal efectuat în sud-vestul Germaniei, de către Silvia Funke et al în 2009 a estimat asocierea între riscul de cancer colorectal, fumat și unele polimorfisme mononucleotidice ale genelor care codifică pentru enzimele cu rol crucial în calea stresului oxidativ: catalaza (CAT), superoxid-dismutaza (SOD), mieloperoxidaza (MPO) și oxid nitric sintetaza endotelială (eNOS): CAT(rs100179), MnSODVal<sup>9</sup>Ala(rs4880), MPOG<sup>463</sup>A(rs2333227) și eNOS Glu<sup>298</sup>Asp(rs1799983). Nici unul din polimorfismele mononucleotidice enumerate nu a fost asociat cu riscul de cancer colorectal, nici o interacțiune semnificativă între durata sau intensitatea fumatului și aceste polimorfisme nu a fost identificată (19).

Asocierea între polimorfismele mononucleotidice SOD Val16 Ala (rs4880) și GPX1 (rs1050450) și riscul de dezvoltare de tumori maligne a fost evaluată de către Blein S și Brendt S în 2014, în cadrul unui studiu caz-control pe un lot semnificativ de 10726 cazuri de cancer mamar și 7532 cazuri de cancer de prostată. Nu s-au identificat asocieri între aceste polimorfisme și riscul de cancer (20).

Studiul nostru se bazează pe studiul asocierii dintre stresul oxidativ și factorul genetic. În acest sens am evaluat gradul de asociere între prezența polimorfismelor unor enzime, cum ar fi CAT, SOD2 și SOD3 și susceptibilitatea sau, dimpotrivă, rezistența la apariția cancerului colorectal.

## **I. CONTRIBUȚII ORIGINALE**

### **CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE**

#### **Includerea pacienților în studiu**

Pentru realizarea acestui proiect s-au luat în studiu 2 loturi de pacienți de la Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova: un lot de subiecți diagnosticați cu cancer colorectal și un lot control. Toți subiecții au fost informați despre scopul studiului și au semnat un consimțământ informat înainte de includerea în studiu.

#### **Recoltarea probelor și a materialului biologic**

Materialul biologic a fost reprezentat de probe de sânge (3 ml de sânge venos recoltat pe EDTA și menținut la 4°C până în momentul extracției de ADN) și țesut tumoral în cazul lotului de studiu și doar sânge pentru lotul control.

#### **Extracție ADN**

Pentru izolarea ADN-ului genomic din probele de sânge recoltate pe EDTA și menținut la 4°C am utilizat kit-ul Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI).

Această metodă urmărește patru etape principale pentru a obține rezultatul final. Protocolul începe cu liza celulelor și a nucleilor acestora (aceasta presupune în primă fază liza hematiilor, urmată de cea a leucocitelor și a nucleilor acestora). Următoarea etapă este opțională și presupune digestia ARN-ului cu ajutorul enzimelor numite RN-aze. În continuare, proteinele eliberate din celule sunt îndepărtate prin precipitare cu ajutorul unei soluții saline, acestea precipită proteinele, în timp ce în soluția rămâne ADN-ul genomic. Ulterior prin precipitare în izopropanol ADN-ul este concentrat și desalzinat. Ultima etapă este una de spălare și deshidratare în etanol, urmând ca la final ADN-ul să fie rehidratat.

#### **Depistarea polimorfismelor genetice folosind tehnica Real – Time PCR**

Analizele genetice pentru identificarea polimorfismelor genelor luate în studiu au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al UMF Craiova ce dispune de echipamentul necesar efectuării acestor teste.

Real time PCR cu sonde Taqman este o tehnică modernă în care spre deosebire de metoda convențională, fragmentul amplificat (ampliconul) este vizualizat pe măsură ce procesul de amplificare înaintază. Această urmărire în “timp real” a procesului de amplificare este posibilă prin marcarea cu molecule fluorescente a primerilor, probelor sau ampliconului.

### **Prelucrarea statistică a datelor**

Cu ajutorul programelor Microsoft®Office Excel® 2007 și Genex Pro 4.4.2.308© am realizat corelații și asocieri între parametrii studiați și rezultatele obținute în urma reacțiilor Real-Time PCR.

Pentru analiza descriptivă a datelor s-a utilizat programul Microsoft Access 2007. Cu ajutorul acestui program s-a realizat baza de date din care s-au extras parametrii ce au fost prelucrați statistic.

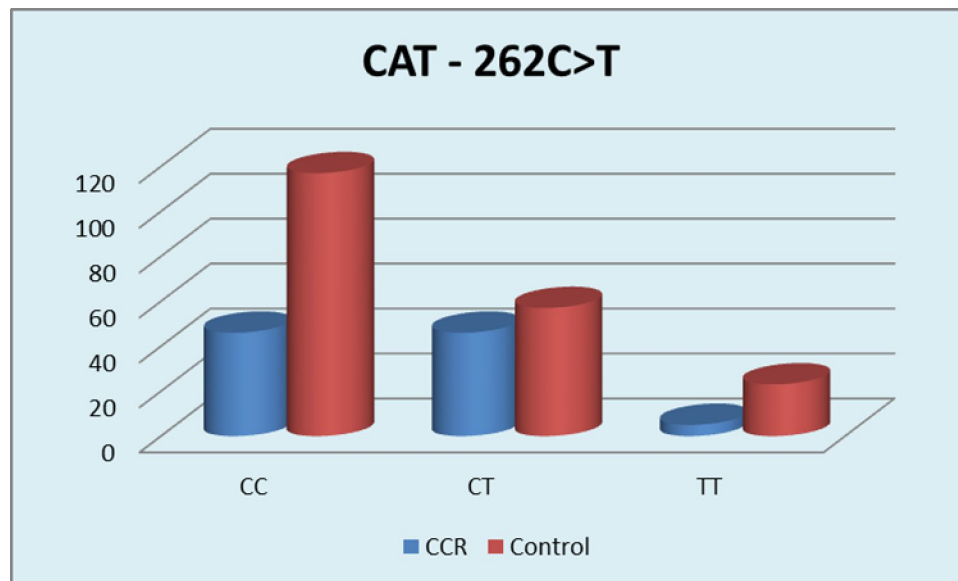
Pentru caracterizarea seriilor de valori din studiu s-au utilizat indicatori statistici, între care media, deviația standard, etc.

## **CAPITOLUL IV**

### **REZULTATE**

În acest studiu au fost implicați 314 de subiecți, dintre care 117 au fost diagnosticați cu cancer colorectal (CCR), iar restul de 197 au reprezentat lotul de control cu subiecți sănătoși.

## 1. Polimorfismul CAT -262C>T (rs1001179)



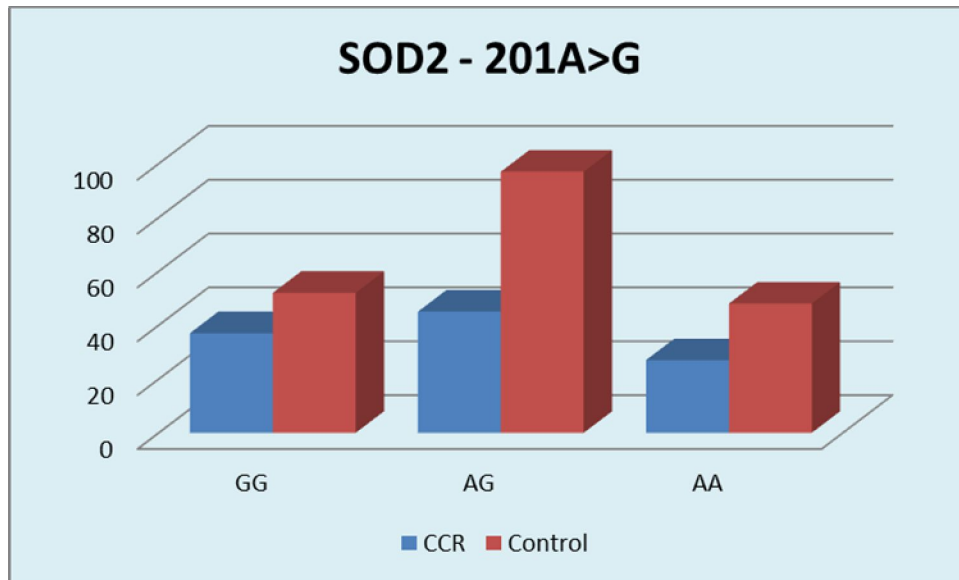
*Fig. 1: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul CAT -262C>T*

Din analiza comparativă a genotipurilor (prezente în figura 1) și a datelor statistice obținute, a rezultat că **pentru polimorfismul CAT -262C>T există o asociere puternică cu cancerul colorectal pentru purtătorii genotipului CT (heterozigot).**

Comparând frecvența genotipului CT cu frecvența genotipului CC (genotip de referință pentru polimorfismul CAT -262C>T) am constatat că prezența genotipului CT este asociat cu un risc de două ori mai mare de a dezvolta boala. În model dominant purtătorii de alela T (genotipurile CT+TT) au un risc mai crescut, de aproximativ 1.1 ori mai mare, de a dezvolta cancer colorectal.

Prin analiza stratificată a acestui polimorfism am obținut însă rezultate și mai interesante. Astfel, **pentru polimorfismul CAT -262C>T, există o asociere foarte puternică pentru purtătorii genotipului CT (heterozigot) de a dezvolta tumori colorectale cu grad bun de diferențiere celulară (G1),** în timp ce acest polimorfismul nu este asociat cu apariția tumorilor moderat și slab diferențiate.

## 2. Polimorfismul SOD2 - 201 A>G (rs4880)



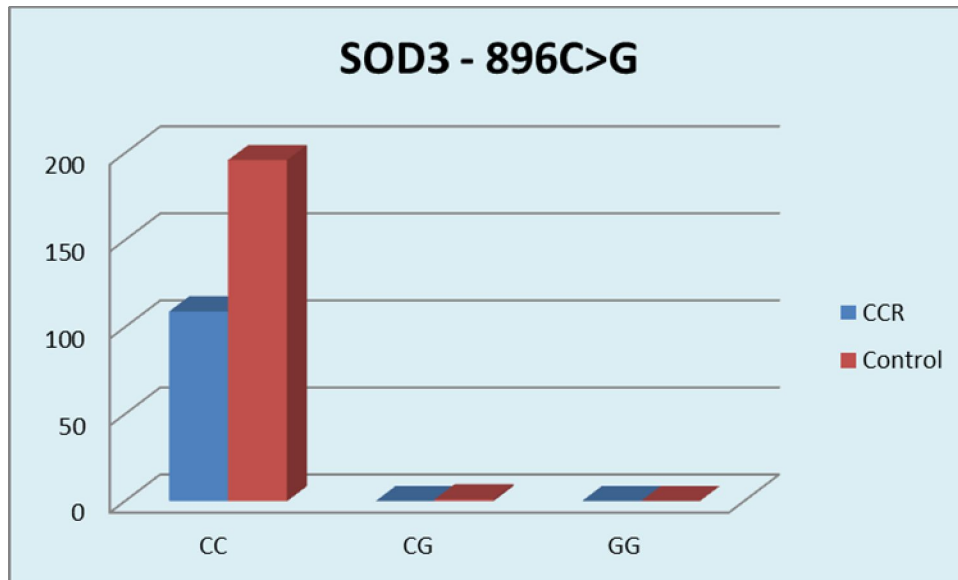
**Fig. 2: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul SOD2–201A>G**

Prin analiza comparativă a genotipurilor (consultând bazele de date internaționale a fost luat ca referință genotipul -GG) și a datelor statistice obținute, a rezultat faptul că polimorfismul SOD2 – 201A>G (a cărui distribuție pe genotipuri și loturi este prezentată în figura 2) nu este asociat cu un risc crescut de cancer colorectal. De asemenea, se mai observă că genotipurile GG și AG reprezintă 76% din variante pentru lotul de control, în timp ce în lotul cu cancer colorectal constituie 76%. Pe de altă parte, purtătorii alelei A reprezintă aproximativ 45% dintre pacienții diagnosticați cu cancer colorectal, în timp ce pentru lotul control acest procent este de 48%.

La analiza stratificată pe baza gradului de diferențiere celulară a tumorilor, se observă faptul că deși pentru polimorfismul SOD2 – 201A>G nu există nici o asociere cu creșterea susceptibilității sau a rezistenței la cancer colorectal.



### 3. Polimorfismul SOD3 -896 C>G



*Fig. 3: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul SOD3-896C>G*

În studiul nostru după cum se poate vedea și în figura 3 care ilustrează repartizarea pe genotipuri și loturi am observat că polimorfismul SOD3 – 896C>G nu este asociat cu un risc crescut de cancer colorectal. De asemenea se mai observă că genotipul CC reprezintă 100% din variante pentru lotul de studiu, având o valoare apropiată și pentru lotul control. În altă ordine de idei purtătorii alelei C reprezintă aproximativ 100% dintre subiecții afectați de cancer colorectal, în timp ce pentru lotul control acest procent se apropie de 100%.

## CAPITOLUL 5

### CONCLUZII

1. Am constatat că pentru polimorfismul CAT - 262C>T, prezența genotipului CT este asociată cu un risc de aproximativ două ori mai mare de a dezvolta cancer colorectal. În model

dominant, purtătorii alelei T (genotipurile CT+TT) au un risc de aproximativ 1.1 ori mai mare de a dezvolta tumori colorectale maligne.

2. În urma analizei stratificate a lotului constituit din subiecți diagnosticați cu cancer colorectal pe baza gradului de diferențiere celulară a tumorilor, am observat ca polimorfismul CAT - 262C>T este înalt asociat cu neoplasmul colorectal, având un risc de două ori și jumătate mai mare de a dezvolta tumori colorectale bine diferențiate.
3. Am constatat că purtătorii alelei A pentru polimorfismul SOD2 – 201A>G prezintă un risc mai ridicat de a dezvolta tumori colorectale bine diferențiate. Altfel spus prezenta alelei A în acest polimorfism crește riscul de a dezvolta această afecțiune. Acest rezultat va trebui confirmat de studii viitoare.
4. Rezultatele obținute pentru polimorfismul SOD3 – 896C>G nu au fost corelate statistic cu riscul pacienților de a dezvolta cancer colorectal.
5. Deși lotul de studiu nu a fost foarte numeros, el a respectat echilibrul statistic Hardy-Weinberg. În mare parte, rezultatele și concluziile studiului efectuat sunt în concordanță cu literatura de specialitate.

## **BIBLIOGRAFIE SELECTIVA**

1. Dixon LB, Balder H.F, Virtanen M.J, Rashidkhani B, Mannisto , S, Krogh, V, van Den Brandt P. A, Hartman A. M-Dietary patterns associated with colon and rectal cancer: results from the Dietary Patterns and Cancer (DIETSCAN) Project. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80: 1003-1011
2. Boyle P., Langmann J.S.- ABC of colorectal cancer 2000 *BMJ Vol.321; 30* : 805-808

3. Yuri Ito, Akiko Ioka, Masahiro Tanaka, Tomio Nakayama and Hideaki Tsukuma . Trends in cancer incidence and mortality in Osaka, Japan: Evaluation of cancer control activities 2009
4. William A Ross Colorectal cancer screening in evolution: Japan and the USA *Journal of Gastroenterology and Hepatology Special Issue: The 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology* 2010;21: S49–S56.
5. Beckman KB, Ames BN, The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998 78:547-581
6. Lu T , Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* 2008 314:1918-1922
7. Radic N, Injac R, Djordjevic A, Strukelj B. Analysis of parameters significant for oxidative stress and cell injury: In Injac R, editor. *The Analysis of Pharmacologically Active Compounds in Biomolecules in Real Samples*. Kerala, India: *Transworld Research Network*, 2009; 169-194
8. Roger B McDonald, *Biology of Aging*, 2014 ISBN978:99-111
9. Shringapure R, Davies KJA, Protein turnover by the proteasome in aging and disease, *Free Radical and Medicine*, 2002; 32(11):1084-1089
10. Berlett BS, Stadtman ER, 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem* 272: 20313-20316
11. Stadman ER, Berlett BS, 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-243
12. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3; 2003:276-285
13. Klauning JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44.2004: 239-267

14. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza- Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 2008
15. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem.* 387; 2006: 365-372
16. Verrax J, Pedrosa RC, Beck R, Dejeans N, Haper T, Calderon PB. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. *Curr. Med. Chem* 16; 2009:1821-1830
17. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007;39(1):44-84
18. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401; 2007:2590-2596
19. Silvia Funke, M Hoffmeister, Brenner H, Chang-Claude J. Effect Modification by smoking on the association between genetic polymorphisms in oxidative stress genes and colorectal cancer risk; *German Research Foundations*; 2009
20. Blein S, Berndt S, Joshi AD, Campa D, Ziegler RG, Riboli E, Cox DG; NCI Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Factors associated with oxidative stress and cancer risk in the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Free Radic Res.* 2014 ; 48(3):380-386