

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ SI FARMACIE

CRAIOVA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

**POLIMORFISME GENETICE ASOCIATE GENELOR NOD2 ȘI
ATG5 ȘI RISCUL DE CANCER GASTRIC**

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

PROF. UNIV. DR. TUDOREL CIUREA

STUDENT DOCTORAND:

FLORESCU DAN NICOLAE

INTRODUCERE

Cancerul gastric este o boală cu debut și evoluție de cele mai multe ori insidioase care implică o întârziere diagnostică asociată cu un prognostic nefavorabil. Cancerul gastric afectează milioane de oameni la nivel mondial, cu o incidență în scădere în special în rândul țărilor care au programe naționale de screening.

Țările care nu beneficiază decât de screening oportunist raportează încă incidențe crescute. Totuși, evoluția recentă a tehnologiilor folosite pentru aparatele de endoscopie ce utilizează endoscoape cu rezoluție înaltă și tehnici ce permit vizualizarea în detaliu a mucoasei și a vascularizației au permis creșterea ratei de diagnosticare a cancerului gastric incipient.

Etiopatogenia complexă a cancerului gastric cuprinde interacțiuni între persistența factorilor de risc ce includ infecția netratată cu *Helicobacter pylori*, fumatul, factori alimentari sau de mediu și susceptibilitatea genetică a fiecărui individ în parte.

Tratamentul de eradicare al infecției cu *Helicobacter pylori* și monitorizarea leziunilor precanceroase dețin un rol cheie în oprirea procesului de carcinogeneză gastrică.

Progresul permanent al tratamentului oncologic și chirurgical nu au reușit să îmbunătățească semnificativ prognosticul pacienților iar atenția cercetărilor s-a centrat pe studiul molecular al mecanismelor de carcinogeneză.

Autofagia este un proces biologic intracelular cu rol controversat și intens dezbătut în apariția și dezvoltarea cancerelor deoarece prin degradarea organelor intracelulare poate asigura necesarul de energie celulelor canceroase ce sunt supuse stresului metabolic. Autofagia este însă implicată în inducerea apoptozei, diferențierea celulară și în recunoașterea și prelucrarea antigenelor virale sau bacteriene prin activarea răspunsului imun înăscut sau dobândit, ceea ce îi conferă și rol de stopare a dezvoltării tumorale.

Mutațiile genelor implicate în autofagie pot altera eficacitatea autofagiei și astfel pot promova procesul de carcinogeneză. Polimorfismele genelor cu rol în autofagie nu

au fost pe deplin studiate până în prezent. Evaluarea acestor polimorfisme poate aduce beneficii importante pentru deslușirea contribuției susceptibilității genetice în interacțiune cu factorii de risc pentru dezvoltarea cancerului.

PARTEA GENERALĂ

EPIDEMIOLOGIE

Cancerul gastric este un tip de afecțiune malignă cu evoluție asimptomatică de cele mai multe ori ce determină întârzierea unui diagnostic precoce. Cu toate că metodele de diagnostic și tratament s-au dezvoltat în ultimele decenii, cancerul gastric reprezintă în continuare cea de-a patra tumoră malignă ca frecvență și a treia cauza de deces a pacienților cu cancer, după cancerul hepatic și pulmonar, în ciuda incidenței sale în scădere. Ferlay și colaboratorii săi au publicat în 2014 date ce privesc incidența cancerelor în funcție de sex și de localizarea geografică.

În România, incidența cancerului gastric este de aproximativ 16.66 / 100,000 locuitori cu un raport bărbați / femei de 2 la 1. În fiecare an în țara noastră aproximativ 3000-4000 cazuri de cancere gastrice sunt diagnosticate, cu o rată anuală de mortalitate de aproximativ 5,9% la femei și 7,7% la bărbați. În România, incidența cancerului gastric ocupă locul 4 la bărbați și al 5-lea la femei în rândul patologiilor maligne și reprezintă a doua cauză de deces cauzată de cancere. Între anii 2000 și 2004, mortalitatea medie a pacienților cu cancer gastric a fost de 16,75 / 100.000 la bărbați și 6,27 / 100.000 la femei, cu o rată ușor descrescătoare în perioada 2005-2009, la ambele sexe (14,68 / 100.000 la bărbați și 5,31 / 100.000 la femei).

PATOGENEZA CANCERULUI GASTRIC

Dezvoltarea cancerului gastric de tip intestinal are loc într-un proces treptat de modificare a mucoasei normale prin proliferare epitelială, urmată de transformare adenomatoasă și mai apoi de apariție a carcinomului.

Procesul de patogeneză este susținut de observarea gastritei cronice atrofice și metaplaziei intestinale la pacienții cu cancer gastric. Acest model de formare a carcinoamele gastrice de tip intestinal a fost descris de Correa și colaboratorii săi care au postulat secvența temporală de modificări preneoplazice care conduce ulterior spre apariția cancerului.

Un aspect important al carcinogenezei gastrice de tip intestinal este dat de existența inflamației cronice. În acest sens implicarea infecției cu *Helicobacter pylori* a fost intens studiată, întrucât persistența infecției conduce la apariția gastritei cronice atrofice, cu pierderea țesutului glandular, urmată de progresia spre metaplazie intestinală, displazie, cancer gastric "in situ" și în final cancer gastric avansat. Studiile efectuate pe modele animale afirmă că displazia de orice grad este reversibilă, deși studiile nu sunt clare cu privire la reversibilitatea displaziei de orice grad.

FACTORI DE RISC

Cancerul gastric este o boală multifactorială ce cuprinde interacțiunea a numeroși factori de risc și este una din puținele patologii maligne a căror etiologie cuprinde pe lângă factori de mediu, dietă sau factori genetici și agenți infecțioși (*Helicobacter pylori*).

Studiile actuale iau în considerare ca factori de risc pentru apariția cancerului gastric și mediul ocupațional, precum lucrul în mediul toxic în mine de cupru sau în siderurgie.

Factorii de risc implicați în carcinogeneza gastrica pot fi încadrați în:

- **FACTORI DE RISC CUNOSCUȚI**
 - infecția cu *Helicobacter pylori*,
 - gastrita cronică atrofică,
 - metaplazia intestinală,
 - displazia,
 - polipi gastrici adenomatoși,
 - fumatul,
 - dieta bogată în oxid nitric,

- stomac operat (în special rezecția gastrică Billroth II),
 - factori genetici,
 - istoric familial de cancer gastric (rude de gradul I),
 - polipoză familială adenomatoasă sau juvenilă,
 - sindrom Peutz-Jeghers.
- FACTORI DE RISC PROBABILI
 - obezitate,
 - anemia pernicioasă,
 - consum crescut de sare.
- FACTORI DE RISC POSIBILI
 - boala Menetrier,
 - nivel socioeconomic scăzut.

FACTORI GENETICI

Precum în majoritatea afecțiunilor maligne, interacțiunea dintre factorii genetici și cei de mediu determină apariția și progresia cancerelor gastrice. Aproximativ 10% din pacienții cu adenocarcinom gastric prezintă istoric familial de cancer gastric ce acționează independent de controlul eradicării infecției cu *Helicobacter pylori* sau a altor factori de mediu.

AUTOFAGIA

Un rol aparte și intens studiat în carcinogeneză de-a lungul ultimelor decenii îl are și procesul de autofagie. Rolul autofagiei în carcinogeneză este controversat.

Activarea autofagiei poate favoriza mecanismele tumorale, deoarece celulele maligne pot folosi procesul de autofagie pentru a supraviețui stresului metabolic. Un mecanism potențial poate fi reprezentat de digerarea propriilor componente celulare (autodigestie) și obținerea de aminoacizi ca o sursă alternativă de energie. În contrast reducerea autofagiei contribuie la tumorigeneză și creștere tumorală prin inhibarea tipului II de moarte celulară.

Autofagia este un proces de autodistrugere ce este important pentru echilibrarea surselor de energie în momentele critice în procesul de dezvoltare și este activat drept răspuns la stresul nutritiv.

Dintre genele implicate în autofagie cu rol studiat în cancerul gastric sunt ULK1, Beclin1, ATG5, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B care și-au dovedit valoarea prognostică prin funcția exercitată de reglatori principali ai întregului proces de formare al autofagozomului.

Gena ATG5 este situată pe brațul lung al cromozomului 6q21 și are rolul de a codifica proteina ATG5, iar împreună cu ATG12 și ATG16L1 formează un complex proteic multimeric, necesar pentru constituirea autofagozomului, cu rol esențial în derularea procesului de autofagie. Proteina ATG5 este implicată într-un mecanism molecular care previne moartea celulelor tumorale în timpul chimioterapiei, iar anumite polimorfisme ale genei ATG5 precum rs2245214 au fost asociate cu susceptibilitate crescută pentru cancer, în special cel tiroidian.

Gena NOD2 este localizată pe brațul lung al cromozomului 16, în poziția 21 (16q21) și este implicată în autofagie prin activarea răspunsului imun, respectiv recunoașterea proteinelor exogene eliberate de virusuri sau bacterii, deși nu are rol în constituirea autofagozomului. Această genă oferă instrucțiuni pentru sinteza proteinelor implicate în funcționarea sistemului imunitar, prin sinteza macrofagelor sau monocitelor. Proteina NOD2 este implicată în mai multe procese care apară organismul prin recunoașterea proteinelor exogene și prin stimularea sistemului imunitar. Odată stimulată de diferite substanțe eliberate de virusuri sau bacterii, NOD2 activează o proteină cunoscută sub numele factorului nuclear kappa-B, care reglează activitatea genelor implicate în reacții inflamatorii și răspunsul imun. Alterarea genei NOD2 poate conduce la numeroase afecțiuni printre care cele mai multe studii amintesc de boli inflamatorii intestinale și de sindromul Blau. Implicarea în carcinogeneză este incertă întrucât studiile oferă informații contradictorii.

PARTEA SPECIALĂ

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Scopul principal al studiilor publicate a fost reprezentat de evaluarea asocierii principalelor polimorfisme localizate în gene implicate în autofagie și susceptibilitatea la cancerul gastric. Aceste variante genetice au rol încă neelucidat sau nu au fost investigate până în prezent.

Evaluarea polimorfismelor selectate ar putea aduce un beneficiu important în înțelegerea rolului autofagiei în carcinogeneza gastrică, precum și explicarea mecanismelor complexe de interacțiune dintre susceptibilitatea genetică a gazdei și alți factori de risc.

OBIECTIVE

Analiza frecvenței polimorfismului NOD2 rs2066844C/T Arg702Trp într-un lot de bolnavi de cancer gastric comparativ cu un lot de subiecți sănătoși pentru a putea aprecia riscul de cancer gastric la persoanele care prezintă variații genice la nivelul genei NOD2.

Studiul frecvenței polimorfismului unei gene cu rol cheie în autofagie (ATG5 rs2245214 C/G) pe un lot de voluntari români deoarece până la aceasta dată nu existau date cu privire la frecvența acestei variante genice în Europa de Est.

În plus frecvența polimorfismului ATG5 rs2245214 C/G a fost studiată și pe un lot de pacienți cu cancer gastric pentru a verifica o eventuală susceptibilitate la cancerul gastric pentru acești pacienți.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am analizat frecvenței polimorfismelor genelor NOD2 și ATG5 loturi separate de de bolnavi de cancer gastric comparativ cu loturi de subiecți sănătoși pentru a putea

aprecia riscul de cancer gastric pentru persoanele care prezintă variații genice la nivelul genei NOD2.

Pentru a putea finaliza cercetarea au fost necesare parcurgerea mai multor etape:

- **Formarea loturilor de studiu** prin stabilirea parametrilor clinico-morfologici de investigat și criteriilor riguroase de includere sau de excludere din studiu:
 - lot martor,
 - lotul pacienților cu cancer gastric,
- **Prelevarea de probe biologice**
 - sânge de la ambele loturi,
 - biopsii chirurgicale sau endoscopice din lotul cu cancer gastric,
 - piese de rezecție gastrică din lotul cu cancer gastric,
- **Teste genetice**
 - folosirea de sonde TaqMan specifice polimorfismului NOD2 rs2066844C/T Arg702Trp prin metoda RealTime PCR,
 - eletroforeză în gel de agaroză,
 - PCR.
- **Analiza statistică** a rezultatelor obținute cu privire la frecvența polimorfismului NOD2 rs2066844C/T Arg702Trp în loturile studiate prin utilizarea:
 - **Testul X^2** - folosirea echilibrului Hardy-Weinberg

- **Odds ratio (OR)** cu interval de incredere 95%, testul p - pentru a stabili eventuale corelații între polimorfismul studiat și riscul de cancer gastric, precum și cu:
 - ✓ localizarea tumorală,
 - ✓ tipul histopatologic conform clasificării Lauren.
- Tip histopatologic intestinal sau difuz.

Cercetările s-au desfășurat atât pe probele disponibile în cadrul biobăncii din Laboratorul de Genomică Umană (componenta retrospectivă) cât și pe probe biologice nou-recoltate de la pacienții înrolați în timpul desfășurării tezei de doctorat (componenta prospectivă) pentru a crește astfel loturile studiate și impactul științific al lucrărilor publicate.

În cadrul Laboratorului de Genomică Umană există o biobancă ce conține o secțiune dedicată probelor obținute de la pacienții cu adenocarcinoame gastrice. Probele biologice disponibile de la pacienții cu această patologie sunt probe de sânge, ADN genomic, ADN complementar, biopsii din țesutul tumoral, peritumoral și normal.

De asemenea, în cadrul biobăncii există un set de probe biologice de la subiecți fără afecțiuni cronice care au constituit lotul control pentru studiul polimorfismelor.

Pacienții diagnosticați cu adenocarcinom gastric în perioada 01.01.2014 – 30.06.2015 în Clinica de Gastroenterologie și Clinicile de Chirurgie I și II ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova au reprezentat componenta prospectivă a studiului desfășurat. Includerea lor în studiu a respectat criteriile de includere și excludere stabilite inițial.

Pacienții care s-au prezentat cu sindroame dispeptice în aceeași perioadă și la care endoscopia digestivă superioară nu a evidențiat leziuni au fost incluși în lotul

martor, după obținerea în prealabil a consimțământului semnat, cu respectarea criteriilor de includere și excludere.

Probele recoltate pentru lotul pacienților cu adenocarcinom gastric au fost reprezentate de:

- Sânge venos recoltat pe tub EDTA – aproximativ 5ml, păstrat la aproximativ 4°C până la inițierea procesului de extracție al ADN-ului,
- Biopsii endoscopice tumorale și peritumorale recoltate în soluții de stabilizator de ARN (RNAlater),
- Piese de rezecție chirurgicală recoltate în soluții de stabilizator de ARN (RNAlater).

Pentru lotul martor probele biologice recoltate au fost reprezentate de sânge venos recoltat pe EDTA și păstrat de asemenea la 4°C până la inițierea procesului de extracție al ADN-ului.

Biopsiile gastrice au fost analizate și diagnosticate în Laboratorul de Anatomie patologică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova. Procedura a constat în mai multe etape:

- ❖ prima etapă a constat în fixarea în formol tamponat 10%,
- ❖ a doua etapă a implicat prelucrarea cu tehnica histopatologică uzuală de includere în parafină,
- ❖ etapa finală a fost reprezentată de colorarea cu hematoxină-eozină.

ANALIZE GENETICE

Identificarea polimorfismelor NOD2 rs2066844C/T Arg702Trp și ATG5 rs2245214 G/C s-a desfășurat în Laboratorul de Genomică Umană în cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova și a urmat minuțios mai multe etape:

- **izolarea ADN-ului genomic din probele recoltate,**
- estimarea **spectrofotometrică** a ADN-ului,
- **metoda RealTime PCR** pentru depistarea polimorfismului cu sondă Taqman specifică,

Extragerea ADN-ului genomic din probele de sânge recoltate și păstrate la 4°C a urmărit protocolul kitului Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Promega, Madison, WI*) și a parcurs următoarele etape:

- ❖ **liza eritocitară și leucocitară** (împreună cu nucleii acestora),
- ❖ **liza ARN-ului** prin folosirea RN-azelor – etapă opțională ce are rolul de a menține greutatea mare a ADN-ului genomic în soluția cu săruri, în timp ce permite îndepărtarea proteinelor celulare,
- ❖ **desalinizarea ADN-ului concentrat** prin precipitare în soluție de izopropanol,
- ❖ **spălarea în soluție de etanol,**
- ❖ **etapa finală** ce impune inițial o deshidratare a ADN-ului urmată de rehidratare.

ANALIZA STATISTICĂ

Am efectuat prelucrarea datelor rezultate cu ajutorul programelor Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) și SPSS versiunea 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Datele pacienților și informațiile obținute au fost salvate în Microsoft Excel și au servit ulterior pentru prelucrarea statistică:

- Analize statistice descriptive cu indicatori statistici:
 - ✓ Media,
 - ✓ Împrăștierea,
- Testul Hardy-Weinberg (test chi square de testare a dependenței χ^2)
- Odds ratio cu intervale de încredere 95%.

Cu ajutorul programului Microsoft Excel am reprezentat grafic rezultatele obținute prin utilizarea de diagrame, tabele și grafice de tipul histogramei.

REZULTATE

În cadrul cercetării pentru studierea implicării polimorfismului NOD2 Arg702 Trp în cancerul gastric am genotipat 322 probe biologice care au provenit de la un lot de 72 de bolnavi de cancer gastric cu confirmare histopatologică de adenocarcinom gastric și de la un lot martor de 250 de persoane sănătoase.

Rigurozitatea criteriilor de excludere au determinat înlăturarea din studiu a pacienților care au avut confirmare histopatologică de limfom gastric sau de leziuni precanceroase și nu de adenocarcinom.

Distribuția subiecților control s-a efectuat astfel încât vârstele, sexul sau etnicitatea să fie similare.

Polimorfismul NOD2 rs2066844 C/T (Arg702Trp) nu a fost deviat semnificativ în lotul control față de valorile așteptate conform echilibrului Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$, $X^2 = 0.24$).

Frecvența genotipurile CC și CT în grupul control și în grupul cu adenocarcinom gastric au fost evidențiate în tabelul II.4. De remarcat faptul că genotipul TT nu a fost regăsit la niciun pacient (tabel II.5).

Nu au fost remarcate diferențe semnificativ statistice între cele două loturi prin compararea fiecărui genotip (genotipul CC a servit drept referință) (OR 0.45, 95% CI: 0.10 - 2.05) sau când am comparat frecvența alelelor (alela C a servit drept referință) (OR 0.46, 95% CI: 0.11 - 2.04).

Asocierea polimorfismului NOD2 rs2066844 C/T (Arg702Trp) cu localizarea tumorală și tipul histopatologic au fost examinate separat și nu au fost observate diferențe semnificative între localizarea tumorală gastrică sau tipul histopatologic și lotul martor de-a lungul analizei stratificate.

Genotipul CC a fost cel mai frecvent întâlnit în rândul lotului cu cancer gastric, dar și în procente similare în populația control.

Alela C a fost regăsită în 98,61% din cazurile lotului cancerului gastric, comparativ cu 97% în lotul martor.

Alela T a fost genotipată în 1,39% din cazurile lotului cancerului gastric, comparativ cu 3% în lotul martor.

În cadrul studiului implicării polimorfismului ATG5 rs2245214 C/G în cancerul gastric am genotipat 138 probe biologice care au provenit de la un lot de 33 de bolnavi

de cancer gastric cu confirmare histopatologică de adenocarcinom gastric și de la un lot martor de 105 persoane sănătoase.

Lotul cu cancer gastric a conținut 33 pacienți cu vârsta medie de 67,6 ani, cu repartiția pe sexe 21 bărbați și 12 femei.

Lotul martor de 105 voluntari sănătoși cu vârste cuprinse între 17 și 75 ani, cu o repartiție pe sexe de 49 bărbați și 56 femei.

Adenocarcinoamele gastrice au fost clasificate conform Clasificării Lauren în adenocarcinoame de tip intestinal 23 cazuri și de tip difuz 10 cazuri.

În ceea ce privește gradul de diferențiere tumorală, din totalul de 34 de cazuri studiate de cancer gastric:

- ❖ 9 au fost G1 (bine diferențiate),
- ❖ 13 au fost G2 (moderat diferențiate),
- ❖ 11 au fost G3 (slab diferențiate și nediferențiate).

Stadializarea adenocarcinoamelor gastrice din stadiu conform clasificării TNM a surprins faptul că majoritatea erau stadii avansate de boală.

- ❖ 4 cazuri stadiu I,
- ❖ 6 cazuri stadiu II,
- ❖ 6 cazuri stadiu III ,
- ❖ 17 cazuri stadiu IV (50%).

În ceea ce privește analiza studiului lotului de voluntari sănătoși frecvențele genotipice ale polimorfismului ATG5 nu a deviat în mod semnificativ față de valorile așteptate în conformitate cu echilibrul Hardy-Weinberg.

Genotiparea polimorfismului studiat în lotul martor a indicat:

- ❖ genotipul CC la 53 de subiecți,
- ❖ genotipul CG la 40 de subiecți,
- ❖ genotipul GG la 12 subiecți.

Am încercat să aflu dacă polimorfismul ATG5 rs2245214C>G se poate corela separat cu localizarea tumorală, gradul tumoral sau stadiul bolii. Analiza stratificată a indicat absența asocierii semnificativ statistice între genotipurile obținute și localizarea tumorală, gradul histologic sau stadiul bolii.

DISCUȚII

Rezultatele studiului meu afirmă lipsa unei corelații semnificativ statistice între polimorfismul studiat și susceptibilitatea la cancerul gastric întrucât distribuția genotipurilor polimorfismului în loturile studiate este asemănătoare.

Rezultate similare cercetării mele au fost raportate într-un studiu portughez care a evaluat mutații ale genei NOD2 și susceptibilitatea la cancer gastric. Studiul portughez a fost realizat pe lot de 150 de pacienți cu cancer gastric și 202 subiecți sănătoși. Frecvențele genotipului pentru R702W/Arg702Trp obținute în urma studiului nu au putut susține o asocierie între diferite tipuri histologice de cancer gastric și polimorfismul studiat. Totuși, același studiu a sugerat că polimorfismul 3020insC reprezintă un factor de risc pentru dezvoltarea cancerului gastric în Portugalia, mai precis pentru adenocarcinoamele de tip intestinal.

Rezultatele studiului portughez sunt susținute și de rezultatele obținute într-un studiu german. Loturile studiate au fost asemănătoare ca număr, cu 171 de pacienți cu cancer gastric și 153 de subiecți sănătoși și au indicat faptul că polimorfismele studiate ale genei NOD2 nu sunt factori de risc pentru cancerul gastric și nu cresc susceptibilitatea la cancer gastric.

În contrast, autorii unui studiu italian ce a inclus 170 de pacienți cu cancer gastric și 156 subiecți sănătoși, admiteau că polimorfismele studiate ale genei NOD2 precum

R702W/ Arg702Trp și 1007fs au fost corelate puternic cu riscul de cancer gastric. Pentru a explica rezultatele diferite Angeletti și colaboratorii săi au incriminat factori cancerigeni de mediu și citokine proinflamatorii induse de NOD2 drept cauze posibile prin care polimorfismele studiate ale genei NOD2 pot crește riscul de cancer gastric.

Un studiu din 2005 elaborat de Papaconstantinou și colaboratorii săi a sugerat că mutațiile genei NOD2 ar putea reprezenta un factor de risc în dezvoltarea cancerului colorectal, după evaluarea variantelor Arg702Trp, G908R și 3020insC la 104 pacienți greci cu cancer gastric și 100 de subiecți sănătoși. Rezultatele publicate indicau frecvența mult mai mare a tuturor mutațiilor în grupul de cancer gastric, comparativ cu grupul sănătos și au susținut ideea creșterii susceptibilității la cancerul gastric a polimorfismelor studiate.

O meta-analiză publicată în februarie 2014 în PloS. a evaluat implicarea polimorfismelor NOD2 în carcinogeneză și asocierea cu creșterea susceptibilității pentru diferite tipuri de cancer. Rezultatele expuse de multiple studii nu au fost concludente de cele mai multe ori sau au oferit informații contradictorii.

În privința cercetării frecvenței polimorfismului ATG rs2245214 C / G pe două loturi de subiecți de etnie română, iar studiul reprezintă singura raportare de acest gen din zona de sud-vest a României.

Rezultatele obținute în cercetarea mea în ceea ce privește frecvența alelor genotipului ATG5 sunt ușor diferite prin comparație cu rezultatele publicate de alte cohorte cauziene, cu o abatere mare pentru frecvența fiecărui genotip. Într-un studiu caz – control olandez, ce a inclus 189 martori sănătoși, genotipurile reprezentate au fost

genotipul CC 35%, genotipul CG 52% și genotipul GG 13%. Acest studiu a sugerat că pacienții purtători ai polimorfismului ATG5 rs2245214 au o probabilitate mai mare de a dezvolta carcinom tiroidian.

Alt studiu raportat ulterior a indicat locii de risc în lupusul sistemic eritematos ce au inclus polimorfismul ATG5 rs2245214. Frecvența alelei G de risc a fost de 0,37 într-un lot control de 12188 de subiecți. Într-un mod similar, un alt studiu care a comparat loturi control americane și suedeze au indicat frecvența alelei G de risc 0,353, respectiv 0,407. Într-un studiu caz – control ce a inclus 952 de subiecți indonezieni nu a fost remarcată o asociere între polimorfismul ATG5 rs2245214 și susceptibilitatea la tuberculoză pulmonară. Frecvența genotipurilor ATG5 din grupul de control a fost 35,8% CC, 48,5% GC și 15,7% GG iar frecvența alelei minore G a fost 39,9.

Alte variante ale ATG5 au fost investigate în mai multe studii de caz. Nu a fost remarcată o asociere între Atg5 M129V (rs34793250) și vârsta la debutul bolii Huntington. Polimorfismul ATG5 rs6568431 a fost inițial asociat cu artrita reumatoidă într-o cohortă din Marea Britanie, dar asocierea nu s-a dovedit semnificativ statistică după corecția Bonferroni.

Harley și colaboratorii au atribuit polimorfismul ATG5 Rs573775 (G / A) unui locus de sensibilitate pentru lupus eritematos sistemic, dar rezultatele nu au fost confirmate într-un studiu finlandez.

Polimorfismele ATG5 (rs12201458 și rs510432) au fost asociate cu apariția astmului. Alela minoră (A) a polimorfismului ATG5 rs12201458 a fost asociată cu un risc

scăzut de astm, în timp ce alela minoră (G) ATG5 rs510432 a fost asociată cu un risc crescut de astm.

Mai multe studii au indicat că variante ale genei ATG5 pot predispuce la boli maligne. În baza datelor din literatura am verificat dacă polimorfismul genei ATG 5 rs2245214 G / C se poate asocia cu riscul de cancer gastric, cu localizarea tumorală, stadializare sau gradul de diferențiere tumorală.

Cercetarea mea a indicat că nu există o asociere semnificativ statistică între prezența polimorfismului ATG5 rs2245214 și apariția cancerului gastric. În mod similar, analiza stratificată nu a putut sugera asocierea prezenței polimorfismului studiat cu gradul histologic de diferențiere tumorală, localizarea tumorală, respectiv stadializarea bolii.

CONCLUZII

- Cancerul gastric este o boală cu etiopatogenie complexă în care susceptibilitatea genetică a gazdei interacționează cu alți factori de risc precum factorii de mediu, dieta sau infecția cu *Helicobacter pylori*.
- Cancerul gastric nu are o simptomatologie specifică și este de multe ori asimptomatic. Frecvent, cancerul gastric este diagnosticat în stadii avansate deoarece nu există program de screening național, iar pacientul se prezintă tardiv, fapt demonstrat și de cercetarea mea întrucât peste 60% dintre pacienți au fost diagnosticați în stadiul III sau IV conform clasificării TNM.
- Necesitatea diagnosticării cancerului gastric precoce reiese din creșterea procentului de supraviețuire la 5 ani.

- Apariția generațiilor noi de aparate de endoscopie ce permit vizualizarea mucoasei la rezoluție înaltă au crescut rata diagnosticărilor cancerelor gastrice incipiente.
- Cercetările mele sunt printre primele raportări cu privire la implicarea polimorfismelor genelor NOD2/CARD15, ATG5 în apariția adenocarcinoamelor gastrice în România.
- Polimorfismul genei NOD2 rs2066844 C/T (Arg702Trp) nu este corelat cu riscul de cancer gastric în populația românească studiată și sunt necesare investigații viitoare suplimentare pentru a elucida contribuția genei NOD2 în carcinogeneza gastrică.
- Polimorfismul genei implicate în autofagie ATG5 rs2245214 nu afectează susceptibilitatea la cancer gastric.
- Frecvența alelei de risc G pentru polimorfismul ATG5 rs2245214 C/G în lotul martor a fost diferită față de alte raportări din literatură datorită variațiilor etnice la nivel mondial.
- Agresivitatea cancerelor gastrice este dată de invazia loco-regională și de metastazarea silențioasă, procese ce au fost surprinse la majoritatea cazurilor diagnosticate întrucât metastazele și invazia seroasei și a structurilor adiacente a fost regăsită la peste 50% dintre pacienții cu cancer gastric înrolați în lotul de studiu pentru evaluarea genotipului ATG5 rs2245214 C/G.
- Se remarcă o creștere a procentului adenocarcinoamelor slab diferențiate și nediferențiate (G3) ceea ce susține datele recente de literatură care surprind

creșterea incidenței adenocarcinoamelor de tip difuz și scăderea incidenței adenocarcinoamelor de tip intestinal.

- Analiza stratificată a cazurilor a infirmat asocierea prezenței polimorfismului ATG5 rs2245214 C/G cu gradul histologic de diferențiere tumorală (G1 – bine diferențiat, G2 – moderat diferențiat, G3 – slab diferențiat și nediferențiat), localizarea tumorală (cardia sau non-cardia), respectiv cu stadializarea cancerelor gastrice.
- Absența corelației polimorfismelor studiate cu riscul de cancer gastric poate fi explicată printr-o posibilă implicare a heterogenității genetice în carcinogeneza gastrică.
- Pentru a se putea clarifica influența polimorfismelor genelor implicate în autofagie asupra susceptibilității la cancer gastric sunt necesare publicarea mai multor studii în cadrul aceleiași populații etnice și pe loturi extinse.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ❖ Wex T, Ebert MP, Kropf S, Dierkes J, Schüttler K, Röcken C, Höcker M, Malfertheiner P. Gene polymorphisms of the NOD-2/CARD-15 gene and the risk of gastric cancer in Germany. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):757-62.
- ❖ Angeletti S, Galluzzo S, Santini D, Ruzzo A, Vincenzi B, Ferraro E, Spoto C, Lorino G, Graziano N, Calvieri A, Magnani M, Graziano F, Pantano F, Tonini G, Dicuonzo G. NOD2/CARD15 polymorphisms impair innate immunity and increase susceptibility to gastric cancer in an Italian population. *Hum Immunol.* 2009 Sep;70(9):729-32. doi: 10.1016/j.humimm.2009.04.026.
- ❖ Papaconstantinou I, Theodoropoulos G, Gazouli M, Panoussopoulos D, Mantzaris GJ, Felekouras E, Bramis J. Association between mutations in the

CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population. *Int J Cancer*. 2005 Apr 10;114(3):433-5.

- ❖ Jingwei Liu, Caiyun He, QianXu, Chengzhong Xing, Yuan Yuan. NOD2 Polymorphisms Associated with Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89340. DOI:10.1371/journal.pone.0089340.
- ❖ Kutikhin AG. Role of NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 gene polymorphisms in cancer etiology. *Hum Immunol*. 2011 Oct;72(10):955-68. doi: 10.1016/j.humimm.2011.06.003.
- ❖ Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- ❖ Orozco G, Eyre S, Hinks A, et al. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Ann Rheum Dis* 2011; 70(3):463-8.
- ❖ International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK2B, KIAA1542 and other loci, *Nat Genet* 2008; 40(2):204-10.
- ❖ Järvinen TM, Hellquist A, Zucchelli M, et al. Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(1):87-92.
- ❖ Martin LJ, Gupta J, Jyothula SS, et al. Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma, *PLoS One* 2012; 7(4):e33454.
- ❖ Usategui-Martín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Del Pino-Montes J, González Sarmiento R. Polymorphisms in autophagy genes are

associated with paget disease of bone. PLoS One. 2015 Jun 1;10(6):e0128984. doi: 10.1371/journal.pone.0128984. eCollection 2015.

- ❖ Plantinga TS, van de Vosse E, Huijbers A, Netea MG, Joosten LA, Smit JW, Netea-Maier RT. PLoS One. Role of genetic variants of autophagy genes in susceptibility for non-medullary thyroid cancer and patients outcome. 2014 Apr 16;9(4):e94086.
- ❖ Qin Z, Xue J, He Y, Ma H, Jin G, Chen J, Hu Z, Liu X, Shen H. Gene. Potentially functional polymorphisms in ATG10 are associated with risk of breast cancer in a Chinese population. 2013 Sep 25;527(2):491-5. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.067. Epub 2013 Jul 10.
- ❖ Kim MS, Song SY, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. APMIS. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers 2011 Nov;119(11):802-7. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02812.x. Epub 2011 Sep 22.
- ❖ An CH, Kim MS, Yoo NJ, Park SW, Lee SH. Mutational and expressional analyses of ATG5, an autophagy-related gene, in gastrointestinal cancers Pathol Res Pract. 2011 Jul 15;207(7):433-7. doi: 10.1016/j.prp.2011.05.002. Epub 2011 Jun 12.
- ❖ Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. J Pathol. 2009 Apr;217(5):702-6.
- ❖ Ferlay J, SI, Ervik M, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2012 [cited 2016 January 25]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- ❖ Arnold M, Moore SP, Hassler S, et al. The burden of stomach cancer in indigenous populations: a systematic review and global assessment. Gut. 2014;63(1):64–71. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305033
- ❖ Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 2: 354-362.

- ❖ Vogelaar IP, van der Post RS, Bisseling TM, et al. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. *Hered Cancer Clin Pract* 2012; 10: 18.
- ❖ Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PloS Med* 2006; 3: e442.
- ❖ Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol* 2005; 90: 114-133.
- ❖ Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE, Tretli S. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer* 1997; 71: 340-344.
- ❖ Møller H. Incidence of cancer of oesophagus, cardia and stomach in Denmark. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1: 159-164.
- ❖ Armstrong RW, Borman B. Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 941-947.
- ❖ Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics 2014. *Ca Cancer J Clin* 2014; 64: 9-29.
- ❖ Globocan (n.d.). Fact Sheets by Population. Retrieved May 17, 2014, from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=642.
- ❖ La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 2010; 21: 1323-1360.
- ❖ Bosetti C, Bertuccio C, Malvezzi M, et al. Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann Oncol* 2013; 24: 2657-2671.
- ❖ International Agency for Research. Stomach cancer. Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *Globocan 2012: Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2012*. Available from: URL: www.globocan.iarc.fr.
- ❖ Wojciechowska U, Didkowska J, Zatonski W. Cancer in Poland – five-year survival rates by regions. The Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology. Warsaw Poland 2010; 15.

- ❖ Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992 Dec 15;52(24):6735-40.
- ❖ Vedat Goral. Etiopathogenesis of Gastric Cancer. Article 4, Volume 17, Issue 6, July 2016, Page 2745-2750 Document Type: Systematic Review and Meta-analysis. DOI: APJCP.2016.17.6.2745.
- ❖ Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al.: Gastric precancerous process in a high risk population: Cohort follow-up. *Cancer Res.* 50:4737-4740 1990.
- ❖ Cai X, Carlson J, Stoicov C, et al.: Helicobacter felis eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology.* 128:1937-1952 2005.
- ❖ Lee CW, Rickman B, Rogers AB, et al.: Helicobacter pylori eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res.* 68:3540-3548 2008.

