

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

LUCRARE DE DOCTORAT

***TRANZIȚIA EPITELIO-MEZENCHIMALĂ ÎN
ADENOCARCINOAMELE DE COLON***

REZUMAT

Coordonator științific

Prof. Univ. Dr. Ciurea Raluca Niculina

Doctorand

Al Khatib (Badiu) Anne-Marie

Craiova 2019

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I - Factori de risc ai adenocarcinoamelor colonice

CAPITOLUL II - Mecanisme carcinogenice în adenocarcinoamele colonice

CAPITOLUL III - Tranziția epitelio-mezenchimală în adenocarcinoamele colonice

CERCETĂRI PERSONALE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

CAPITOLUL IV - Material și metode

IV.1. Materialul studiat

IV.2. Metode utilizate în cercetare

CAPITOLUL V – Rezultate

V.1. Studiul histopatologic al adenocarcinoamelor colonice

V.2. Corelații statistice între parametrii histopatologici

V.3. Studiul imunohistochimic al adenocarcinoamelor colonice

V.4. Corelații statistice între markerii histopatologici și imunohistochimici

CAPITOLUL VI – Discuții

VI.1. Discuții asupra studiului histopatologic al adenocarcinoamelor colonice

VI.2. Discuții asupra studiului imunohistochimic al adenocarcinoamelor colonice

CAPITOLUL VII – Concluzii

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

INTRODUCERE

Tranziția epitelio-mezenchimală (TEM) este implicată atât în timpul dezvoltării embrionice cât și în răspunsul fiziologic la diverse agresiuni [249]. Finalizarea TEM este semnalizată prin degradarea membranei bazale și domândirea unui fenotip mezenchimal, caracterizat prin capacitate migratorie, invazivitate și creșterea rezistenței la apoptoză [86]. Astfel, se produce o alterare a joncțiunilor intercelulare cu pierderea progresivă a polarității celulare și reorganizarea citoscheletului. Mai mult, scade expresia E-caderinei, ce menține adeziunile intercelulare și organizarea citoscheletului, iar expresia N-caderinei va crește sub acțiunea factorilor Twist, Snail, Slug și ZEB1 [48].

Asocierea TEM cu progresia și cu prognosticul pacienților cu CCR este controversată, fiind necesare investigații suplimentare pentru identificarea și stabilirea rolului acesteia. Prezentul studiu își propune evaluarea expresiei unor markeri implicați în TEM (markeri de adeziune celulară, factori de transcripție, markeri epiteliali precum și mezenchimali), dar și asocierea acestora cu parametrii histopatologici investigați. Luând în considerare rolul acestui proces în progresia cancerului, proteinele implicate în desfășurarea TEM ar putea oferi o strategie terapeutică țintită cu scopul de a preveni invazia, metastazarea și recurențele tumorale.

Cuvinte cheie: adenocarcinom colonice, tip histologic, grad de diferențiere, E-caderină, N-caderină, P-caderină, Snail, Slug, Twist, ZEB1, AE1/AE3, Fibronectină, Vimentină.

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. Factori de risc ai adenocarcinoamelor colonice

În această capitol au fost descrise date din literatura de specialitate referitoare la repartiția în funcție de grupele de vârstă și sexe. Deasemenea, au fost descriși factorii de risc protectori, dar și cei predispozanți în apariția adenocarcinoamelor de colon.

CAPITOLUL II. Mecanisme carcinogenice în adenocarcinoamele colonice

În această secțiune au fost prezentate căile patogenice în carcinogeneza colorectală, predispoziția genetică și condițiile predispozante nonereditare

CAPITOLUL III. Tranziția epitelio-mezenchimală în adenocarcinoamele colonice

Secțiunea a inclus cele mai recente date referitoare la aspectele tranziției epitelio-mezenchimale, precum și principalele mecanisme care induc acest proces.

CERCETĂRI PERSONALE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Studiul efectuat și-a propus o evaluare completă și amănunțită a carcinogenezei colorectale, în special adenocarcinoamele colonice, precum și identificarea factorilor implicați în evoluția nefavorabilă a acestora, cu scopul de a identifica posibile ținte prognostice și terapeutice.

CAPITOLUL IV. Material și metode

Studiul a cuprins un număr de 276 de cazuri de adenocarcinoame colonice, diagnosticate în perioada 2017-2018.

Studiul **clinico-epidemiologic** a avut în vedere următorii parametri: sexul, vârsta și repartiția pe ani calendaristici.

Studiul **histopatologic** al adenocarcinoamelor colonice investigate, a urmărit identificarea principalilor parametri histopatologici ai acestora în legătură cu prognosticul: patnul de creștere tumoral, gradul de diferențiere tumorală, infiltratul inflamator, necroza, invazia vasculară, invazia perineurală, profunzimea invaziei, adenopatia metastatică, metastazele la distanță.

Pentru studiul **imunohistochimic** au fost selectate un număr de 60 de cazuri, cu diagnosticul de adenocarcinom de colon, pentru care s-a urmărit evaluarea expresiei unor markeri implicați în TEM, cum sunt E-caderină, N-caderină, P-caderină, Snail, Slug, Twist, ZEB1, AE1/AE3, Fibronectină, Vimentină.

Rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice, utilizându-se teste statistice pentru evaluarea diferențelor dintre scorurile de imunoreactivitate obținute pentru fiecare tumoră în parte, considerând diferență semnificativă un nivel $p < 0.05$.

CAPITOLUL V. Rezultate

Studiul clinico-epidemiologic efectuat a cuprins un număr de 276 de cazuri de adenocarcinoame de colon (ADC) selectate în intervalul de timp 2017-2018, rezultând că incidența cea mai mare a fost în anul 2017 (144 din cazuri - 52,2%), 178 (64,5%) de pacienți fiind de sex masculin și 100-36,2%, au aparținut grupei de vârstă 71-80 ani.

Dintre cazurile analizate, cele mai multe au fost de tip mucinos (91-33%), majoritatea fiind G2 în 178 cazuri (64,5%). Infiltratul inflamator a fost prezent în 140-50,7% de cazuri, necroza în 130 - 47,1% din cazuri, invazia vasculară în 130 de cazuri (47.1%) și cea perineurală în 71 de cazuri (25,5%). Din punct de vedere al pofunzimii invaziei tumorale, am observat ca majoritatea tumorilor diagnosticate au fost T3 (135 - 48,9%), iar multe din cazurile analizate (133 - 48,2%) au fost N0, totuși în 30 de cazuri (10.9%) au fost descoperite metastaze la nivelul plămânului și ficatului. Astfel mare parte din cazuistica analizată a fost încadrată în stadiul III tumoral (113 – 40,9%). Am obținut asocieri semnificative statistic între stadiul tumoral și gradul tumoral, stadiul tumoral și invazia vasculară, respectiv cea perineurală, dar și între gradul tumoral și invazia vasculară și cea perineurală ($p < 0,05$, testul chi-square).

Analiza imunohistochimică a cuprins un total de 60 de cazuri de ADC, rezultatele obținute fiind apoi interpretate din punct de vedere statistic în raport cu parametrii histopatologici. Imunoreacția pentru E-caderină a fost identificată în 77% din cele 60 de cazuri de ADC analizate imunohistochimic, iar în raport cu avansarea stadiului tumoral s-a observat o descreștere a imunomarcajului. În plus, am evidențiat aspecte semnificative statistic ale expresiei E-caderinei în raport cu gradul de diferențiere tumorală, stadiul tumoral și invazia perineurală ($p < 0,05$). Imunoreacția pentru P-caderină a fost identificată în 74,6% din cazuri, iar pentru N-caderină în 56% din cazuri, în ambele situații observându-se o creștere a imunomarcajului în raport cu stadiul tumoral și o asociere semnificativ statistică cu acesta. Studiul imunoexpresiei factorilor de transcripție a arătat o reacție pozitivă Twist, Snail, Slug, ZEB1 în 75,5%, 74,66%, 75,83%, respectiv 72,58% din cazuri, prezentând o creștere a marcajului celulelor tumorale o dată cu avansarea stadiului tumoral, aceștia fiind semnificativ statistic asociați cu stadiul tumoral și invazia perineurală ($p < 0,05$). Imunoexpresia AE1/AE3 a fost identificată în 85,08% din cazuri, iar Fibronectina în 78,5% dintre acestea, ambele având o creștere în raport cu stadiul tumoral și un aspect semnificativ statistic în raport cu gradul tumoral ($p < 0,05$), iar Vimentina a fost negativă în toate cazurile de ADC, la nivel epitelial. Analiza statistică a valorilor caderinelor a relevat, corelație liniară negativă între E-caderină și N-caderină (test Person). E-caderina a mai prezentat corelație liniară negativă și cu AE1/AE3 (test Perarson), N-caderină cu AE1/AE3, precum și cu Fibronectina, acestea prezentând un aspect liniar pozitiv (test Pearson). Nu în ultimul rând a fost descoperită și corelație liniară pozitivă între P-caderină și AE1/AE3.

CAPITOLUL VI. Discuții

CCR este al treilea cel mai diagnosticat tip de cancer și una dintre principalele cauze de deces, iar ADC reprezintă un subtip al acestora ce se dezvoltă din mucoasa colonică, fiind o tumora epitelială [83]. Marea majoritate a CCR (70%) sunt diagnosticate ca fiind moderat diferențiate [19,110], iar stadializarea tumorală este de departe cel mai important predictor de prognostic al evoluției clinice pentru pacienții cu CCR.

Caderinele sunt componenta transmembranară a joncțiunilor de aderență. Acestea mediază adeziunea intercelulară și se conectează de citoscheletul actinei prin asocierea cu cateninele [108]. E-caderina este o glicoproteină transmembranară calciu dependentă, exprimată în majoritatea țesuturilor epiteliale, ce formează o joncțiune stransă care conectează celulele adiacente. Una din principalele descoperiri ale TEM este pierderea adeziunii celulare cu scăderea expresiei E-caderinei ce duce la progresia tumorală, metastazare și un prognostic nefavorabil [72]. P-caderina este o glicoproteină de adeziune calciu dependentă, care deține un rol crucial în conservarea integrității structurale a țesutului epitelial. Ea reglează mai multe procese celulare homeostatice, dintre care menținerea unei arhitecturi tisulare și este importantă pentru diferențierea celulară, forma, polaritatea, creșterea celulei, dar și migrarea acesteia [291]. Procesul TEM, mai este cunoscut și ca switch-ul caderinelor, ceea ce duce la pierderea E-caderinei și dobândirea N-caderinei, ce este un marker mezenchimal ce poate promova motilitatea, dar și invazia celulelor canceroase [249].

Represorii transcripționali ai E-caderinei, ZEB1/ZEB2, Twist și Snail/Slug, sunt asociate cu TEM. Twist este un factor de transcripție ce aparține familiei proteinelor helix-loop-helix, implicate în TEM și în procesele invazive [101]. Snail este unul dintre cei mai buni promotori ai TEM, fiind considerat cu rol prognostic în CCR. Asemănător Snail, Slug este un factor de transcripție zinc-finger, având aceleași proprietăți ca acesta, precum represia E-caderinei și activitatea anti-apoptotică, cu un rol crucial în organogeneză și neutralizare [86]. ZEB1 suprimă gena interleukinei 2, dar și pe cea a promotorului E-caderinei, aspect ce poate induce TEM [48]. Mai mult, ajută la procesul de invazie și metastazare [178]. AE1/AE3 face parte din clasa citocheratinelor, ce sunt filamente intermediare de cheratină găsite în citoscheletul intracitoplasmatic al țesutului epitelial. Cocktailul de citocheratine, este potrivit pentru a distinge carcinoamele de malignitățile non-epiteliale și se folosește pentru a facilita clasificarea tumorilor. Fibronectina este o glicoproteină a matricei extracelulare, ce joacă un rol crucial în adeziunea

celulară, creștere, migrare și diferențiere [160,318]. A fost descoperit că Fribronectina este exprimată puternic la nivelul vascularizației tumorale și mediază angiogeneza în timpul tumorogenezei, oferind astfel un potențial rol în progresia tumorală [318].

CAPITOLUL VII. Concluzii

- Analiza clinico-epidemiologică pentru perioada de timp cuprinsă între anii 2017-2018, a indicat faptul că incidența cea mai mare a fost înregistrată în anul 2017 (52,2%), majoritatea pacienților fiind de sex masculin (64,5%), cu vârste cuprinse în intervalul 71-80 de ani (36,2%);
 - Studiul histopatologic al cazurilor analizate a evidențiat 33% cazuri de ADC de tip mucinos, 31,2% cazuri cu ADC cribriform tip comedo-carcinom, 14,1% ADC cu celule în inel cu pecete, 10,5% tip serat, 5,8% micropapilar și 5,4% medular;
 - Studiul gradului de diferențiere tumorală, a evidențiat 9,1% din cazuri cu G1, 64,5% G2 și 26,4% G3, fiind semnificativ asociat cu invazia vasculară ($p=0,000$), invazia perineurală ($p=0,031$) și prezența infiltratului inflamator ($p=0,047$), majoritatea fiind G2;
 - Analiza stadiului tumoral a arătat faptul că majoritatea cazurilor studiate au fost încadrate în stadiul III (40,9%), fiind moderat diferențiate (30,1%) și au fost semnificativ asociate cu invazia vasculară ($p=0,000$) și invazia perineurală ($p=0,000$);
 - Analizata infiltratului inflamator a relevat prezența acestuia în 50,7% de ADC, iar distribuția acestuia în funcție de paternul de creștere a arătat că a fost găsit în 80% din cazurile de ADC medular și 67,4% din cele cribriforme tip comedo-carcinom;
 - Necroza tumorală a fost descoperită în 47,1% din cazuri, fără corelație statistică cu alți parametrii histopatologici analizați, iar distribuția în funcție de paternul de creștere a arătat că aceasta a fost prezentă în 79,1% din ADC cribriforme de tip comedo-carcinom și în 46,7% din cele de tip medular;
 - Invazia vasculară a fost prezentă în 47,1% din cazurile analizate, iar cea perineurală a fost găsită în 25,7% dintre acestea;
- Studiul imunohistochimic a fost efectuat pe un număr de 60 de cazuri de ADC, utilizând markeri implicați în TEM:
- Imunorecția pentru E-caderină a fost identificată în 77% din ADC, marcajele fiind superioare în cazul tumorilor G1, precum și în stadiile precoce ale bolii, iar analiza statistică a

evidențiat asocieri semnificative cu gradul de diferențiere tumorală ($p=0,028$), stadiul tumoral ($p=0,034$) și invazia perineurală ($p=0,050$);

- Imunomarcajul P-caderinei a fost identificat în 74,6% din cazuri, fiind superior în cazul tumorilor G3 și în stadiile avansate de boală și analiza statistică a evidențiat asocieri semnificativ statistice cu gradul de diferențiere tumorală ($p=0,043$), stadiul tumoral ($p=0,002$) și invazia vasculară ($p=0,006$), în plus a fost descoperită o corelație liniară pozitivă între P-caderină și AE1/AE3;
- Marcajul N-caderinei a fost găsit în 56% din cazurile analizate, fiind mai bine evidențiat în G3 și stadiile III/IV tumoral, având o asociere semnificativ statistică cu gradul tumoral ($p=0,009$);
- Imunoexpresia Twist a fost identificată în 75,5% din cele 60 de cazuri analizate, având o asociere semnificativ statistică cu gradul tumoral ($p=0,010$), stadiul tumoral ($p=0,000$), invazia vasculară ($p=0,001$) și invazia perineurală ($p=0,000$);
- Imunomarcajul Snail a fost prezent în 74,66% din cazuri, având o asociere semnificativ statistică cu stadiul tumoral ($p=0,002$), invazia vasculară ($p=0,009$) și invazia perineurală ($p=0,001$);
- Imunorecția Slug a fost identificată în 75,83% din ADC analizate, având o asociere semnificativ statistică cu stadiul tumoral ($p=0,000$), invazia vasculară ($p=0,024$) și invazia perineurală ($p=0,006$);
- Reacția ZEB1 a fost identificată în 72,58% din cazuri, cu o asociere semnificativ statistică între marcajul ZEB1, stadiul tumoral ($p=0,021$) și invazia perineurală ($p=0,014$);
- Imunoexpresia AE1/AE3 a fost identificată în 85,08% din cele 60 de cazuri, având o asociere semnificativ statistică cu gradul tumoral ($p=0,004$), stadiul tumoral ($p=0,001$) și invazia perineurală ($p=0,017$);
- Imunoreacția Fibronectinei a fost identificată în 78,5% din ADC având o asociere semnificativ statistică cu gradul tumoral ($p=0,038$) și invazia vasculară ($p=0,002$);
- Expresia Vimentinei a fost negativă la nivel epitelial în toate cele 60 de cazuri de ADC analizate;

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

19. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118:628-638.
48. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, et al. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*. 2007;26:711-724.
72. Dorudi S, Sheffield JP, Poulsom R, et al. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol*. 1993;142:981-986.
83. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-173.
86. Ganesan R, Mallets E, Gomez-Cambronero J. The transcription factors Slug (SNAI2) and Snail (SNAI1) regulate phospholipase D (PLD) promoter in opposite ways towards cancer cell invasion. *Mol Oncol*. 2016;10(5):663-676.
101. Gomez I, Peña C, Herrera M, et al. TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival. *PLoS One*. 2011;6(3):e18023.
108. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:622-634.
110. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. IARC Press. 2010:134-146.
160. Kuczyk MA. Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2012;3(4):787-790.
178. Liu LG, Yan XB, Xie RT, et al. Stromal Expression of Vimentin Predicts the Clinical Outcome of Stage II Colorectal Cancer for High-Risk Patients. *Med Sci Monit*. 2017;23:2897-2905.
249. Rosivatz E, Becker I, Bamba M, et al. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*. 2004;111:711-719.
291. Vieira AF, Paredes J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14:178.

318. Yi W, Xiao E, Ding R, et al. High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(6):3145-3153.