

Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova
Școala Doctorală

TEZĂ DE DOCTORAT

***EVALUAREA TRANSLAȚIONALĂ A EXPRESIEI
CELULELOR STEM CANCEROASE LA PACIENȚII CU
CANCER COLORECTAL***

-REZUMAT-

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. Adrian Săftoiu**

**Student doctorand,
Irina Florina Cherciu**

CRAIOVA

2015

CUPRINS

INTRODUCERE	2
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	3
MATERIAL ȘI METODĂ	3
REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	5
Rolul endomicroscopiei confocale laser în evaluarea celulelor stem canceroase din carcinomul colorectal.....	6
Evaluarea imunohistochimică a celulelor stem canceroase putative din carcinomul colorectal.....	7
Implicațiile biologiei moleculare în evaluarea expresiei genelor specifice celulelor stem canceroase din carcinomul colorectal.....	9
CONCLUZII.....	11
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	13

CUVINTE CHEIE

Cancer colorectal (CCR), celule stem canceroase (CSC), endomicroscopie confocală laser (CLE), imunoendomicroscopie, biomarkeri CD133, CD166, CD44, biologie moleculară qRT-PCR, imunohistochimie (IHC).

INTRODUCERE

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă al treilea cel mai comun cancer din lume, cu aproximativ 447.000 de pacienți diagnosticați în 2012 în Europa, reprezentând 13% din totalul cancerelor din această regiune. Sunt menționate variații mari ale incidenței CCR de-a lungul Europei, iar în România CCR constituie a doua cauză de morbiditate și mortalitate, atât în cazul femeilor cât și al bărbaților (1). Creșterea continuă a prevalenței CCR în țările în curs de dezvoltare este asociată cu două aspecte: creșterea speranței de viață și implicit îmbătrânirea globală a populației, la care se adaugă stilul de viață dezechilibrat prin diete sărace în fructe și legume, dar bogate în alimente procesate, grăsimi și carne roșie, asociate cu lipsa activității fizice (2).

CCR a fost și continuă să fie intens studiat. În ciuda progreselor din oncologie legate de utilizarea schemelor terapeutice ce asociază noile terapii biologice și medicamente citotoxice, problema eșecului tratamentului și a recidivei rămâne o piatră de încercare în ceea ce privește supraviețuirea. Aproximativ 50% dintre pacienții cu CCR supraviețuiesc la 5 ani după diagnostic (2,3), de unde derivă și **scopul** studiului nostru: îmbunătățirea ratei de supraviețuire a pacienților cu CCR.

Actual sunt descrise două modele posibile ale carcinogenezei în CCR: modelul stochastic (proces aleatoriu), care presupune faptul că fiecare celulă canceroasă prezintă o capacitate egală de a iniția și de a susține creșterea tumorală și modelul reprezentat prin „ipoteza celulelor stem canceroase”, care afirmă că tumorile au o organizare ierarhică și numai celulele stem canceroase (CSC) au potențial cancerigen (4,5). Pe lângă capacitatea de a determina apariția, progresia și reapariția cancerului, CSC prezintă și o chemorezistență naturală. În acest context, apare nevoia de identificare și evaluare a acestor celule.

Identificarea și localizarea CSC prin intermediul markerilor propuși până în prezent este dificilă, la fel ca evidențierea diferitelor căi alterate în tumorigeneza CCR. Izolarea CSC poate fi realizată prin țintirea și selectarea subpopulațiilor de celule tumorale pe baza expresiei unuia sau mai multor markeri celulari de suprafață, precum CD133, CD166, CD44, CD24, CD29, Lgr5, EpCAM (ESA), ALDH-1, Msi-1, DCAMLK1 sau receptori EphB, sugerați în literatura

de specialitate (5, 6). Acest subiect rămâne însă controversat prin lipsa unor markeri moleculari specifici general acceptați.

În consecință, studiul CSC este o provocare ce implică o varietate de tehnici, incluzând imunohistochimia (IHC) și microscopia cu fluorescență, microdisecția laser, biologia moleculară prin qRT-PCR și endomicroscopia confocală laser (CLE).

Endomicroscopia confocală laser este o tehnică endoscopică de ultimă generație ce permite evaluarea histologică în timp real a mucoasei colorectale, prin utilizarea unor agenți de contrast cu administrarea topică sau sistemică. Dincolo de caracterizarea aspectelor morfologice ale mucoasei, imunoendomicroscopia (asocierea CLE cu anticorpi marcați fluorescent și peptide ce se leagă specific de o țintă) a făcut posibilă examinarea funcțională până la nivel molecular. Dovedită a fi fezabilă în cercetarea fundamentală, CLE a parcurs deja primii pași spre translația în practica clinică, conturându-se un rol însemnat în diagnosticul precoce al CCR și posibilitatea promovării unor terapii individualizate vizând CSC (7, 8). Cu toate că cercetările privind CSC s-au amplificat pe parcursul ultimilor ani, complexitatea biologiei acestora nu a permis până în prezent descrierea unei strategii incontestabile de identificare și izolare (9).

În acest context, am asociat o metodă imagistică modernă unor tehnici diagnostice consacrate, urmărind atingerea următoarelor **obiective**: 1) Identificarea, evaluarea și optimizarea celor mai relevanți biomarkeri ai CSC din CCR; 2) Evaluarea fezabilității privind utilizarea CLE pentru examinarea CSC în CCR și validarea acestei tehnici prin IHC și qRT-PCR.

CONTRIBUȚII PERSONALE

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul s-a desfășurat în cadrul *Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie, UMF Craiova* și al *Clinicii de Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de*

Urgență din Craiova și a cuprins mai multe loturi de pacienți cu CCR incluși prospectiv în perioada octombrie 2012 – septembrie 2015.

Lotul I a inclus 126 pacienți diagnosticați cu CCR într-un studiu privind particularitățile demografice, clinice și anatomopatologice. Diagnosticul prezumtiv de CCR a fost ridicat în urma prezenței următoarelor semne și simptome: discomfort abdominal, rectoragii, hematochezie, tulburări de tranzit, inapetență, scădere ponderală, anemie. Colonoscopia cu biopsierea formațiunii tumorale, urmată de examen histopatologic, a stabilit cu certitudine diagnosticul de cancer rectal sau colonic.

Pacienții au fost incluși într-o bază de date în care au fost notate date generale de identificare, istoric medical, date clinice și paraclinice, informații privind tratamentul urmat și supraviețuirea. Toți pacienții au primit un formular de consimțământ informat, explorările desfășurându-se în concordanță cu Declarația de la Helsinki privind Principiile Etice ale Cercetării Medicale ce Implică Subiecți Umani, menționată pe website-ul „World Medical Association”.

Analiza statistică

Pentru înregistrarea și analiza datelor am utilizat programul Microsoft Office Excel®. Statistica descriptivă a variabilelor cantitative a implicat aplicarea funcțiilor Excel medie, maxim, minim, deviație standard. Variabilele calitative au fost exprimate procentual.

Lotul II a inclus 13 pacienți diagnosticați cu adenocarcinom colorectal. Minimum două biopsii pereche din țesut normal și tumoral, cu un diametru de aproximativ 3 mm, au fost prelevate în timpul colonoscopiei și incubate la întuneric cu anticorpi marcați fluorescent anti-CD44, CD133 și CD166, fiind examinate prin CLE (Pentax EC-3870 CIFK). Secvențele de endomicroscopie achiziționate au fost ulterior analizate utilizând software-ul de procesare a imaginii ImageJ (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SUA*). Pentru numărarea CSC au fost selectate cel puțin cinci imagini pentru fiecare fragment de țesut examinat, prezentând cea mai intensă fluorescență.

Analiza statistică

Rezultatele numărării celulelor stem au fost exportate în programul Excel, fiind exprimate ca medie \pm deviație standard. În vederea evaluării raportului linear al expresiei

CSC in biopsiile perecheam aplicat coeficientul de corelație Pearson (r), toate analizele fiind efectuate la un nivel al semnificației statistice de 5% ($p < 0.05$).

Lotul III a inclus 45 pacienți cu adenocarcinom de colon într-un studiu imunohistologic privind expresia și colocalizarea markerilor pentru CSC CD133 și CD166. Au fost înregistrate date privind dimensiunea tumorii, gradul de invazie, existența metastazelor în ganglionii limfatici și la distanță, stadializarea tumorii, gradul de diferențiere. Studiul histologic a implicat metode clasice de colorație pentru diagnostic, precum hematoxilină-eozină și a fost condus independent de doi anatomopatologi, prin metodologia dublu orb. În vederea analizei semicantitative a expresiei și colocalizării CD133 și CD166 au fost utilizate tehnici de imunohistochimie enzimatică și imunofluorescență. Metoda de lucru a urmat un algoritm standard, cu anumite ajustări în funcție de anticorpii folosiți pentru realizarea imunomarcajelor: PROM1 (CD133) MAB10525, ALCAM (CD166) HPA010926, Ki-67 M7240, ab91353, ab27478.

Analiza statistică

Diferențele dintre grupurile de investigat au fost analizate aplicând testul Student t și testul ANOVA, pe când corelațiile au fost evaluate utilizând testul Pearson. Diferențele au fost considerate statistic semnificative pentru $p < 0.05$.

Lotul IV a cuprins 60 de pacienți diagnosticați cu CCR, pentru care au fost prelevate biopsii pereche de țesut tumoral și mucoasă normală colorectală, supuse ulterior analizei expresiei genice a CD133 și CD166 (51 cazuri) și CD44 (19 probe perechi). Biopsiile de țesut tumoral și mucoasă normală au fost recoltate de la toți pacienții în timpul colonoscopiei, simultan cu probele destinate analizei imunohistochimice și endomicroscopice. Pentru măsurarea nivelului de exprimare a celor trei gene din probele pereche a fost folosită reacția de polimerizare în lanț cantitativă (qRT-PCR) în două etape. ADN-ul complementar (ADNc) sintetizat prin revers-transcripție a fost cuantificat folosind tehnologia TaqMan.

Analiza statistică

Pentru comparația expresiei genice în probele pereche a fost utilizat testul non-parametric Wilcoxon pentru diferența rangurilor a două eșantioane pereche. Testul Student bilateral (*two-tailed*) sau testul t împerecheat a fost utilizat pentru determinarea gradului de

semnificație a diferenței dintre nivelele expresiei genice în probele pereche. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic pentru $p < 0.05$.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul privind caracteristicile demografice, clinice și anatomopatologice a inclus 126 de pacienți diagnosticați cu CCR, cu vârsta medie de $61,65 \pm 13,25$ ani și limite între 24 și 83 ani. S-a observat o incidență crescută în rândul pacienților peste 50 de ani, 85,66% dintre pacienții diagnosticați încadrându-se în grupele de vârstă peste această limită. Repartiția pe sexe a lotului studiat a relevat că 61% dintre pacienți au fost bărbați, iar în ceea ce privește mediul de proveniență majoritatea pacienților au fost din mediul urban. La examenul histopatologic, 75,8% dintre tumori au fost reprezentate de adenocarcinoame moderat diferențiate. Localizarea formațiunilor tumorale a avut o distribuție de peste 60% la nivelul rectului și sigmoidului. Având în vedere perioada limitată de desfășurare a studiului, supraviețuirea a putut fi calculată doar la 3 ani de la diagnostic (70,37%).

Rolul endomicroscopiei confocale laser în evaluarea celulelor stem canceroase din adenocarcinomul colorectal

În vederea evaluării endomicroscopice a expresiei celulelor stem canceroase, au fost propuși spre utilizare trei biomarkeri: CD133, CD166 și CD44.

Imunomarcarea cu anticorpul anti-CD133 a condus la rezultate slabe, doar 10 imagini putând fi selectate și analizate. Numărătoarea celulelor a relevat un număr de $16,3 \pm 3,87$ celule/secțiune în țesutul tumoral și $37,45 \pm 24,36$ celule/secțiune în mucoasa normală ($p < 0,01$).

Țesuturile marcate cu anticorpul anti-CD166 nu au putut fi evaluate endomicroscopic, imaginile fiind lipsite de o expunere corespunzătoare a contrastului fluorescent, similar cu observațiile unui studiu precedent (10).

După imunomarcarea cu anticorpul anti-CD44 au fost salvate în total 537 de imagini ce au prezentat un semnal fluorescent distinct. Cele mai clare 65 de imagini au fost stocate, prelucrate și evaluate prin numărarea manuală a celulelor stem, utilizând programul ImageJ. Biopsiile standard din țesutul normal au relevat un aspect bine definit al structurilor mucoasei,

cu cripte de dimensiuni normale și distribuție simetrică asociat unui număr redus de CSC. În țesutul tumoral caracteristicile descrise mai sus s-au pierdut, arhitectura prezentând un aranjament neregulat, cu cripte distorsionate și structuri greu reconoscibile, prezența CSC fiind semnificativ crescută. Evaluarea CLE a imaginilor selectate a relevat $34,92 \pm 16$ celule/secțiune în țesutul tumoral și $22,77 \pm 11,65$ celule/secțiune în cazul țesutului normal ($p=0,037$). În ceea ce privește corelația dintre numărul de celule stem cuantificate prin CLE și stadializarea T și N a cancerului colorectal, majoritatea pacienților au fost încadrați în stadiul T3, N0 sau N1.

Numărul de celule marcate pentru CD44 a fost mai ridicat în țesutul tumoral comparativ cu țesutul normal, diferența dintre cele două tipuri de țesuturi fiind relevantă din punct de vedere statistic în stadiul T3/4: $p=0,028$, $r=0,622$, pe când pentru N0: $p=0,1$, $r=0,92$ și pentru N1: $p=0,1$, $r=0,8$. În grupul supus evaluării prin CLE, 5 tumori au fost gradate ca G1, 6 ca G2 și doar 2 ca G3. Media numărului de CSC în țesut tumoral, raportat la gradul de diferențiere al tumorii, a fost următoarea: pentru G1 $42,8 \pm 18,8$ celule/secțiune, pentru G2 $34,7 \pm 13$ celule/secțiune și pentru G3 $19 \pm 9,89$ celule/secțiune. Media numărului de CSC numărate în mucoasa normală, raportat la gradul de diferențiere al tumorii adiacente, a fost după cum urmează: pentru G1: $24,2 \pm 14,55$ celule/lamă, pentru G2 $24,6 \pm 10,76$ celule/lamă și pentru G3 $13,5 \pm 0,7$ celule/lamă. Cu toate că s-a observat o reducere a numărului de CSC marcate prin CD44 odată cu reducerea gradului de diferențiere tumorală, diferențele înregistrate nu au fost relevante din punct de vedere statistic.

Acesta este primul studiu ce utilizează CLE ca metodă imagistică de evaluare a unor markeri ai CSC din CCR, studiile precedente axându-se pe evaluarea endomicroscopică a angiogenezei (11,12,13). Ca urmare a studiului nostru putem susține fezabilitatea CLE ca metodă de examinare a formațiunilor tumorale, însă pentru optimizarea tehnicii sunt necesare studii suplimentare implicând un spectru mai larg de biomarkeri ai CSC, cu protocoale de imunomarcare bine stabilite și un număr mai mare de pacienți. Deși rezultatele noastre nu au fost statistic semnificative în toate cazurile (probabil datorită numărului redus de pacienți incluși în lotul de studiu), și a fost observată numai o corelație parțială cu stadializarea tumorală și gradul de diferențiere tumorală, ar trebui luate în considerare mai multe aspecte favorabile pentru examinarea prin CLE. Utilizarea țesutului proaspăt reduce riscul de apariție al artefactelor asociate metodelor anatomopatologice de prelucrare, în acest caz fiind necesară administrarea agenților de contrast după un protocol prestabilit. Principalul avantaj al tehnicii este reprezentat de obținerea imaginilor la scurt timp după recoltarea fragmentului de țesut,

ceea ce are potențialul de a accelera considerabil procedurile diagnostice. Mai mult, aplicarea imunoendoscopiei *in vivo* promite rezultate în timp real care ar putea facilita procesul de selectare a pacienților în vederea aplicării terapiilor personalizate și, de asemenea, ar oferi posibilitatea de evaluare a răspunsului la tratament și a evoluției pacientului (14,15).

Evaluarea imunohistochimică a celulelor stem canceroase putative în adenocarcinomul colonic

În studiul nostru, evaluarea imunofluorescentă triplă CD133/CD166/Ki67 a condus la o prima observație: ambii anticorpi CD133 și CD166 au fost exprimați, în proporții diferite, atât în țesutul normal cât și în biopsiile prelevate din țesutul tumoral. De asemenea, s-a înregistrat o creștere graduală a expresiei CD133 de la mucoasa normală, la displazia de grad scăzut și până la displazia de grad înalt.

Expresia CD133 a fost diminuată în țesutul normal al mucoasei colonice, comparativ cu țesutul displazic sau neoplazic. CD133 a fost prezent preponderant în celulele de la baza criptelor colonice, aspect raportat și în studiile precedente (16,17,18). Cel mai comun tipar de expresie a fost colorația citoplasmatică punctiformă „dot-like”, cu o diseminare membranară redusă.

În țesutul tumoral, colorația specifică CD133 a fost detectată atât în citoplasmă cât și în membrana plasmatică apicală a celulelor situate între entități similare țesutului glandular. Global, ariile cu expresie medie a CD133 au fost mai extinse în țesutul displazic ($11802.46 \pm 6538.75 \mu\text{m}^2$) comparativ cu țesutul normal ($7076.48 \pm 3721.93 \mu\text{m}^2$) ($p=0.0069$) și cu cel tumoral ($8193.62 \pm 4776.23 \mu\text{m}^2$) ($p=0.0185$). În ceea ce privește indexul de proliferare, am obiectivat o corelație inversă moderată cu aria de expresie a CD133 în mucoasa normală ($r=-0.409$). În stadiile precoce am determinat o arie de expresie mai vastă ($9490.44 \pm 4853.18 \mu\text{m}^2$) comparativ cu cea din stadiile avansate ($6133.98 \pm 3951.196 \mu\text{m}^2$) ($p=0.010$).

În ceea ce privește **expresia CD166** în mucoasa normală, am observat o prevalență membranară de-a lungul lumenului și pereților laterali ai celulelor situate la baza criptei, sugerând că, în calitate de moleculă de adeziune celulară, CD166 poate juca un rol important în menținerea integrității nișei celulelor stem sau în orientarea celulelor din baza criptelor (17,19,20).

Reactivitatea țesutului tumoral față de anticorpul anti-CD166 s-a manifestat atât citoplasmatic cât și membranar, cu o expresie mai pronunțată totuși la nivelul membranei. În ansamblu, tumorile au manifestat un tipar heterogen de imunomarcare. Procentul ariei marcate cu CD166 în epiteliul tumoral a variat de la 0.89% la 28.86% din aria imaginii salvate sub obiectivul de 40× (între 377.8 μm^2 și 12252.65 μm^2).

Indexul de proliferare a demonstrat o corelație inversă moderată cu aria de expresie a CD166 pentru adenocarcinoamele confirmate ($r=-0.428$).

Corelația cu stadializarea tumorală a condus la observația că expresia anticorpului a fost mai pronunțată doar în stadiile avansate ale tumorilor slab diferențiate ($5581.73 \pm 3275.67 \mu\text{m}^2$) față de stadiile incipiente ($2466.30 \pm 1742.11 \mu\text{m}^2$) ($p=0.039$).

Colocalizarea CD133/CD166 a fost evidentă în special la nivelul membranei celulelor aparținând întregului spectru de tumori colonice, coeficientul cu cea mai mare valoare fiind înregistrat în stadiile incipiente (0.77 ± 0.088) comparativ cu tumorile avansate (0.63 ± 0.154) ($p=0.0014$).

În privința gradelor de expresie imunohistochimică a celor doi biomarkeri, literatura indică variații considerabile. Astfel, procentul de marcarea cu CD133 a fost raportat ca variind între 15.3% și 91.4% (16,17,18,21,22), în timp ce pentru CD166 reactivitatea țesutului tumoral a variat între 34% și 76% (17,19,20). Colorația specifică CD133 a fost exprimată în țesutul tumoral preponderant la nivel citoplasmatic, iar în cazul CD166 îndeosebi la nivel membranar, în concordanță cu rezultatele raportate anterior (16,19, 21, 22, 23).

În ansamblu, expresia CD133 s-a corelat cu cea a CD166 în cazul tuturor tipurilor de țesut, însă cu nivele mai ridicate de corelație în cazul leziunilor neoplazice ($r=0.306$). Leziunile displazice au prezentat grade de corelație chiar mai ridicate ($r=0.52$). În alte studii, s-a observat de asemenea corelația CD133-CD166 și absența unei corelații a celor doi biomarkeri cu CD44, de unde reiese și posibilitatea ca analiza combinată a celor trei markeri să fie superioară în identificarea cazurilor cu risc scăzut, mediu și înalt de CCR (24).

Implicațiile biologiei moleculare în evaluarea expresiei genelor specifice celulelor stem canceroase în carcinomul colorectal

qRT-PCR este metoda de referință pentru măsurarea expresiei genice, făcând posibilă detecția diferenței de câteva copii de mRNA pe celulă.

În studiul nostru, am urmărit evaluarea a trei gene specifice PROM1/CD133, AICAM/CD166 și CD44, a căror eficiență în identificarea CSC și a tumorilor cu prognostic negativ a fost deja sugerată de numeroase alte studii care au utilizat tehnici imunohistochimice sau de analiză genetică. Similar literaturii, analiza qRT-PCR a probelor pereche incluse studiu a relevat exprimarea celor trei gene atât în tumoră cât și în mucoasa normală colorectală (24,25,26).

Expresia CD44 a fost evaluată în 19 probe pereche. În 15 cazuri (78.95%) expresia CD44 a fost mai ridicată în țesutul tumoral comparativ cu țesutul peritumoral neinvadat și în restul de 4 cazuri (21.05%) diferența dintre probele pereche a fost biologic nesemnificativă (Figura 1).

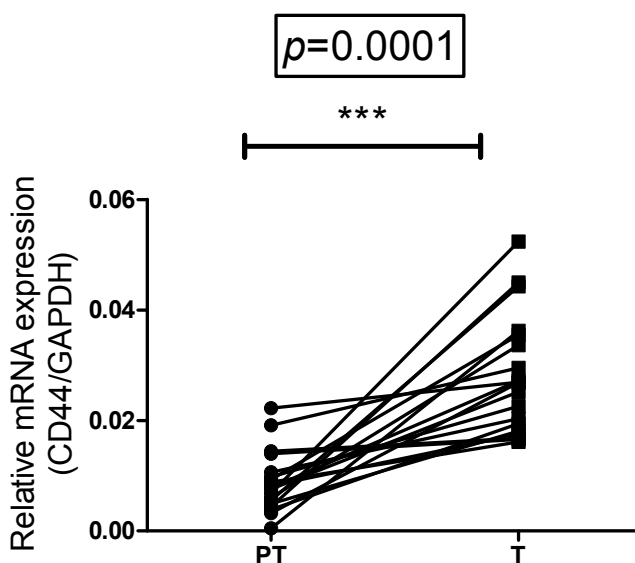


Figura 1. Expresia genei CD44 în țesutul tumoral versus țesut colorectal normal. Rezultatele s-au obținut prin raportarea genei de studiat la GAPDH

Expresia PROM1/CD133 a fost mai ridicată în țesutul normal comparativ cu probele de țesuturi tumorale asociate în 15 cazuri (46.88%); în 7 cazuri (21.88%) expresia a fost mai ridicată în țesutul tumoral și în cele 10 cazuri rămase (31.25%), diferența dintre probele pereche a fost nesemnificativă biologic (Figura 2).

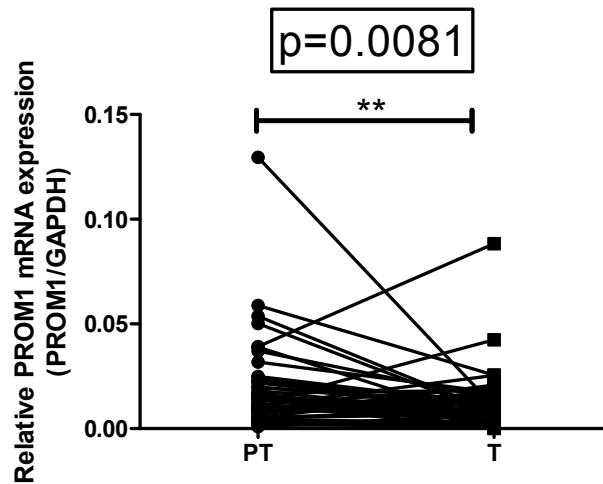


Figura 2. Expresia genei PROM1/CD133 în țesut tumoral versus țesut normal colorectal.

Rezultatele s-au obținut prin raportarea genei de studiat la GAPDH

Expresia ALCAM/CD166 a fost crescută în țesutul tumoral comparativ cu probele de mucoasă normală pereche în 5 cazuri (15,63%), în 4 cazuri (12,5%) expresia a fost mai mare în țesutul normal și în cele 23 de cazuri rămase (71,88%) diferența dintre probele pereche a fost nesemnificativă biologic (Figura 3).

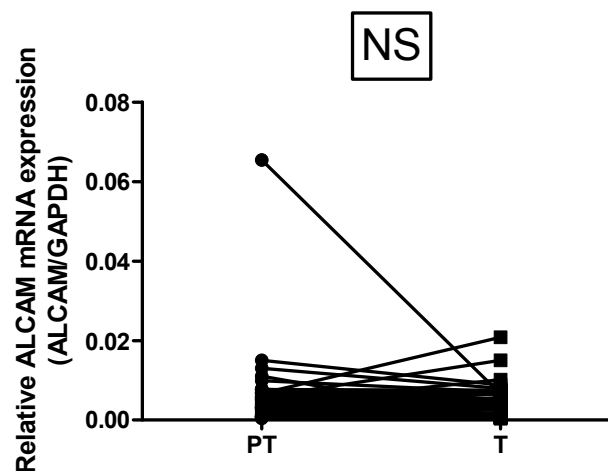


Figura 3. Expresia genei ALCAM/CD166 în țesut tumoral versus țesut normal colorectal.

Rezultatele s-au obținut prin raportarea genei de studiat la GAPDH

În studiul nostru expresia CD44 a fost mai ridicată în țesutul tumoral, în concordanță cu alte date recent publicate (27), fiind în același timp și în consens cu expresia marcată a CD166 în țesutul neoplazic. Pe de altă parte, gena CD133 a fost exprimată preponderent în țesutul

normal, contrar unora dintre rezultatele menționate în literatura de specialitate. Astfel, expresia CD133 este descrisă ca având un caracter heterogen în diverse tipuri de țesut, fără o relevanță statistică (28), în timp ce alte studii susțin o expresie mai ridicată în țesutul tumoral (29,30). Deși în literatură se observă o inconsecvență a tipului și gradelor de expresie genetică a markerilor CSC, în studiul nostru metoda qRT-PCR a condus la rezultate semnificative din punct de vedere statistic, prezentând astfel un potențial înalt pentru evaluarea CSC din neoplasmul colorectal.

CONCLUZII

- Cancerul colorectal (CRC) reprezintă a doua cauză de mortalitate în România, pentru ambele sexe, iar în cadrul studiului nostru datele demografice, clinice și histopatologice înregistrate au fost în concordanță cu rezultatele prezentate în literatură.
- Carcinogeneza în CCR este descrisă în literatura prin doua modele: stochastic și „ipoteza celulelor stem canceroase”. Evaluarea celulele stem canceroase (CSC) prin tehnici imagistice moderne a reprezentat direcția de cercetare în studiul nostru.
- Endomicroscopia confocală laser (CLE) este o tehnică endoscopică de ultimă generație care permite scanarea unui țesut până la nivel molecular, înlesnind obținerea unui diagnostic histologic în timp real, dar și o analiza computerizată *offline* a imaginilor achiziționate.
- Imunoendomicroscopia reprezintă asocierea examinării CLE cu biomarkeri mențiți să marcheze fluorescent ținte specifice. În studiul nostru, dintre cei trei biomarkeri utilizați, CD44 s-a dovedit fezabil pentru imunomarcarea și evaluarea endomicroscopică a CSC. Imunomarcarea cu anticorpi anti-CD133 necesită o ajustare a protocolului de lucru, rezultatele fiind parțial satisfăcătoare, în timp ce biomarkerul CD166 nu s-a dovedit util în identificarea CSC prin CLE.
- Constatările studiului nostru pilot dovedesc utilitatea tehnicii CLE pentru studiul molecular al CSC și reprezintă o bază pentru studii suplimentare. Timpul redus dintre colectarea probelor și obținerea imaginilor endomicroscopice ale țesuturilor imunomarcate face metoda CLE adecvată translatării în practica clinică.

- Studiul imunohistochimic sugerează colocalizarea CD133-CD166 ca reprezentând un eveniment precoce în tumorigeneză. De asemenea, coexpresia acestor doi markeri ar putea fi utilă în aprecierea prognosticului și stratificarea pacienților cu CCR, având în vedere coeficientul de colocalizare ridicat din tumorile bine diferențiate și în stadiu precoce.
- Similar evaluării endomicroscopice și imunohistochimice, evaluarea genetică a celor trei biomarkeri a condus la observația unei exprimări a CSC atât în țesutul tumoral cât și în cel normal colorectal, în diverse proporții și cu preponderența în țesutul normal a CD133 și în țesutul tumoral a CD44 și CD166.
- Asocierea CLE cu tehnici imunohistochimice și genetice permite evaluarea expresiei markerilor CSC din CCR.
- Sunt necesare studii suplimentare pentru identificarea acelor markeri ai CSC specifice CCR, cu rol în diagnostic, prognostic și dezvoltarea unor terapii individualizate, menite să țintească subgrupul CSC.

Bibliografie selectivă:

1. Ferlaya J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rossob S, Coeberghc JWW, Comber H, Formana D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013; 49: 1374-1403
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
3. Adam R, Haller DG, Poston G et al. Toward optimized front-line therapeutic strategies in patients with metastatic colorectal cancer - an expert review from the International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT) 2009. *Ann Oncol* 2010; 21: 1579-1584.
4. Rocco A, Compare D, Nardone G, Cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis: Experimental evidence and unsolved questions, *World J Gastrointest Oncol*. 2012; 4(3): 54–59.
5. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(3): 363-71.

6. Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E et al. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:1097–1104
7. A. L. Polglase, W. J. McLaren, S. A. Skinner, R. Kiesslich, M. F. Neurath, and P. M. Delaney, “A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and the lower-GI tract,” *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 62, no. 5, pp. 686–695, 2005.
8. Goetz M, Kiesslich R. Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 298:G797-G806.
9. **Cherciu I, Bărbălan A, Pirici D, Mărgăritescu C, Săftoiu A.** *Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. Current Health Sciences Journal*. 2014 Jul-Sep;40(3):153-61. doi: 10.12865/CHSJ.40.03.01. PMID: 25729599
10. **Cherciu I, Cartana T, Streata I, Ioana M, Saftoiu A.** *Molecular imaging of cancerous stem cells for assessment of rectal cancer Current Health Sciences Journal Vol. 41, No. 4, 2015 DOI: 10.12865/CHSJ.41.04.16*
11. Cârțână T, Săftoiu A, Gruionu LG, Gheonea DI, Pirici D, et al. (2012) Confocal Laser Endomicroscopy for the Morphometric Evaluation of Microvessels in Human Colorectal Cancer Using Targeted Anti-CD31 Antibodies. *PLoS ONE* 7(12): e52815
12. Gao J, Knutsen A, Arbman G, Carstensen J, Frånlund B, Sun XF. Clinical and biological significance of angiogenesis and lymphangiogenesis in colorectal cancer. *Dig Liver Dis*.2009;41:116–122
13. Gheonea DI, Cârțână T, Ciurea T, Popescu C, Bădărău A, Săftoiu A. Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies. *World Journal of Gastroenterology* 2011;17(1):21–27.
14. Nakai Y, Shinoura S, Ahluwalia A, Tarnawski AS, Chang KJ. Molecular imaging of epidermal growth factor-receptor and survivin in vivo in porcine esophageal and gastric mucosae using probe-based confocal laser-induced endomicroscopy: proof of concept. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63(3):303-7.
15. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with

- confocal endo- microscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138: 435-446.
16. Fabrizi E, di MS, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L. Therapeutic implications of colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2010;16:3871-3877
 17. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010;103:382-390
 18. Coco C, Zannoni GF, Caredda E, et al. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:71
 19. Tachezy M, Zander H, Gebauer F, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166)--its prognostic power for colorectal cancer patients. *J Surg Res* 2012;177:e15-e20
 20. Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 2004;57:1160-1164
 21. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, et al. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2010;24:1201-1212
 22. Choi D, Lee HW, Hur KY, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009;15:2258-2264
 23. Hostettler L, Zlobec I, Terracciano L, Lugli A. ABCG5-positivity in tumor buds is an indicator of poor prognosis in node-negative colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2010;16:732-739
 24. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 2009;27:844-850
 25. Chen KL, Pan F, Jiang H, Chen JF, Pei L, Xie FW, Liang HJ. Highly enriched CD133(+)/CD44(+) stem-like cells with CD133(+)/CD44(high) metastatic subset in

- HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 2011; 28: 751–763. doi: 10.1007/s10585-011-9407-7. PMID:21750907
26. Galizia G, Gemei M, Del Vecchio L, Zamboli A, Di Noto R, Mirabelli P, Salvatore F, Castellano P, Orditura M, De Vita F, Pinto M, Pignatelli C, Lieto E. Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch Surg*. 2012; 147: 18 doi: 10.1001/archsurg.2011.795. PMID:22250106
 27. Jing, F., Kim, H.J., Kim, C.H., Kim, Y.J., Lee, J.H., & Kim, H.R. (2015). Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *International Journal of Oncology*, 46, 1582-1588.
 28. Giampieri R, Scartozzi M, Loretelli C, et al. Cancer Stem Cell Gene Profile as Predictor of Relapse in High Risk Stage II and Stage III, Radically Resected Colon Cancer Patients. Castresana JS, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e72843. doi:10.1371/journal.pone.0072843.
 29. Artells R, Moreno I, Díaz T, Martínez F, Gel B, et al. (2009) Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 46: 642–9. doi: 10.1016/j.ejca.2009.11.003
 30. Huang X, Sheng Y, Guan M. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol*.2012;21:103–107.