

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA  
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT  
REZUMAT

IMPLICAȚIILE INFLAMAȚIEI ȘI  
REMODELAREA CELULELOR  
ENTERICE GLIALE ÎN CANCERUL  
COLORECTAL

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:  
PROF. UNIV. DR . MARIA IANCAU

STUDENT-DOCTORAND:  
PUIU ELENA-ANCA (TÂRTEA)

CRAIOVA  
2017

## Cuprins

Introducere .....	3
Partea I. Stadiul cunoșterii .....	3
Partea a II-a. Contribuții proprii.....	4
Scop și obiective.....	4
Material și metode.....	4
Rezultate.....	7
Evaluarea celulelor enterice gliale care au exprimat GFAP din sistemul nervos enteric.....	7
Evaluarea infiltratului leucocitar intratumoral .....	8
Evaluarea proliferării celulelor tumorale.....	8
Corelații între parametrii evaluați la pacienții incluși în studiu.....	8
Concluzii .....	8
Bibliografie.....	9

**Cuvinte cheie:** adenocarcinom colorectal, celule enterice gliale, infiltrat leucocitar intratumoral, index de proliferare tumorală

## Introducere

Cu toate că s-au făcut progrese mari, atât în ceea ce privește evoluția și patogenia cancerului colorectal, cât și screeningul și metodele diagnostice și terapeutice, acest tip de neoplasm continuă să fie al treilea cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat în lume și, de asemenea, a patra cauză principală de deces la nivel mondial [1]. Mecanismele moleculare care stau la baza apariției acestei neoplazii sunt numeroase și, nu de puține ori, blocarea căilor de semnalizare intra/intercelulare a avut rezultate benefice, influențând în sens negativ tumorigeneza colorectală, acest principiu stând și la baza apariției terapiilor țintite molecular. Cu toate acestea, această neoplazie crează mari probleme, atât ca morbiditate cât și ca mortalitate, de unde rezultă că lucrurile nu sunt întru totul bine cunoscute și este necesar, în continuare, să fie cercetate și mai multe posibile căi implicate în patogenia acestui tip de neoplasm, pentru a descoperi noi ținte terapeutice și pentru a reduce indicatorii statistici negativi în ceea ce privește această boală.

Am ales această temă de cercetare doctorală pornind, pe de o parte, de la date epidemiologice, iar pe de altă parte, de la suspiciunea implicării în carcinogeneza colorectală a unor elemente ale sistemului nervos periferic, enterogliile, împreună cu elementele inflamatorii.

Am structurat această lucrare în două părți, în conformitate cu normele și principiile actuale, referitoare la redactarea unei teze de doctorat.

Prima parte cuprinde trei mari capitole. În primul capitol, am realizat o recenzie a celor mai noi date referitoare la cancerul colorectal, punând accent, în primul rând, pe factorii de risc și pe principalele elemente de carcinogeneză colorectală, pentru a putea înțelege ulterior mecanismele prin care celulele enterice gliale și elementele inflamatorii influențează carcinogeneza colorectală. Celulele enterice gliale și elementele inflamatorii le-am analizat în ultimele două capitole ale primei părți.

În cea de-a doua parte, am expus contribuțiile proprii la tema de doctorat abordată. Astfel, după ce am structurat scopul și obiectivele studiului, am descris materialul și metodele utilizate, expunând preparatele anatomic patologice îndeosebi la tehnica microscopiei multispectrale, utilizată pentru prima dată în analiza expresiei celulelor enterice gliale în cancerul colorectal. Ulterior, am efectuat un studiu clinico-epidemiologic al pacienților incluși în studiu, cu scopul de a utiliza aceste date în analiza expresiei celulelor enterice gliale, infiltratului leucocitar intratumoral și gradului de proliferare tumorală. De asemenea, am realizat corelații între parametrii evaluați la pacienții incluși în studiu, după care, am comparat datele cercetării mele cu cele existente în literatură la ora actuală, cu referire directă sau indirectă la tema abordată. În final, am structurat concluziile desprinse din cercetările acestui studiu.

## Partea I. Stadiul cunoșterii

Cancerul colorectal (CCR) este al treilea cel mai frecvent diagnosticat tip de cancer în lume și, de asemenea, a patra cauză principală de deces la nivel mondial, în anul 2012 înregistrându-se peste 1.3 milioane de cazuri noi (9.7% din totalul neoplasmelor, excluzând alte cancere cutanate, în afară de melanom) și a determinat 690 000 de decese (8.5% din totalul deceselor cauzate de cancer, excluzând alte cancere cutanate, în afară de melanom) [1].

Înțelegerea interacțiunii factorilor adiționali din micromediul tumoral, cum ar fi celulele enterice gliale sau celulele inflamatorii, cu celulele neoplasmului colorectal poate elucidă multe dintre căile patogeniei neoplasmului colorectal.

Despre celulele enterice gliale, considerate mult timp doar cu rol de suport pentru neuronii enterici, se cunoaște foarte bine, la ora actuală, rolul lor în menținerea homeostaziei neuronilor

enterici, în suportul și stabilitatea sistemului nervos enteric din peretele intestinal, în neurotransmisia enterică, de asemenea, se știe că pot constitui o sursă importantă a substratului pentru enzimele implicate în sinteza de neurotransmițători, dar și rolul important în reglarea funcțiilor barierei intestinale [2-8]. Studiile menționate anterior sugerează faptul că celulele enterice gliale, prin intermediul factorilor solubili pe care îi sintetizează, joacă un rol important în menținerea barierei intestinale și în controlul proliferării celulare, de unde se poate deduce că afectarea integrității lor în adenocarcinomul colorectal ar constitui un element favorizant al proliferării și metastazării celulare.

Este puțin probabil ca inflamația să determine CCR sporadic, deoarece majoritatea celulelor imune intratumorale sunt recrutate după formarea tumorii și, în acest caz, inflamația nu precede, ci urmează inițierii tumorale colorectale [9]. Cu toate acestea, după inițierea tumorală, micromediul tumoral recrutează celule inflamatorii, care pot genera acumularea de mutații suplimentare în genomul celulelor neoplazice, contribuind astfel la progresia tumorală [10 - 13].

## **Partea a II-a. Contribuții proprii**

### **Scop și obiective**

Prezentul studiu și-a propus evaluarea completă și amănunțită a remodelării celulelor enterice gliale și a elementelor inflamatorii în cancerul colorectal, cu scopul de a identifica posibile ținte terapeutice și de prognostic.

Studiul a fost efectuat prospectiv și, pentru îndeplinirea scopului principal, s-a urmărit îndeplinirea următoarelor obiective:

- Alcătuirea unei baze de date, care să conțină principalii parametri epidemiologici, clinici, histopatologici, precum și imunohistochimici ai pacienților incluși în acest studiu;
- Identificarea și definirea parametrilor imunohistochimici ai celulelor enterice gliale și ai elementelor inflamatorii, cu scopul corelării lor ulterioare cu trăsăturile clinico-patologice ale pacienților incluși în studiu, în vederea evaluării remodelării celulelor enterice gliale și a infiltratului leucocitar intratumoral;
- Evaluarea proliferării celulare, a influenței sistemului nervos simpatic, prin analiza expresiei receptorilor B2 adrenergici, în vederea efectuării de corelații cu expresia celulelor enterice gliale și a infiltratului leucocitar intratumoral;
- Identificarea unor posibile ținte moleculare și de prognostic, cu scopul aplicării unor terapii precoce și diferențiate, în funcție de corelarea remodelării celulelor enterice gliale și infiltratului leucocitar intratumoral cu influențele simpatic, gradul de proliferare tumorală, precum și cu caracteristicile clinico-patologice ale pacienților incluși în studiu.

### **Material și metode**

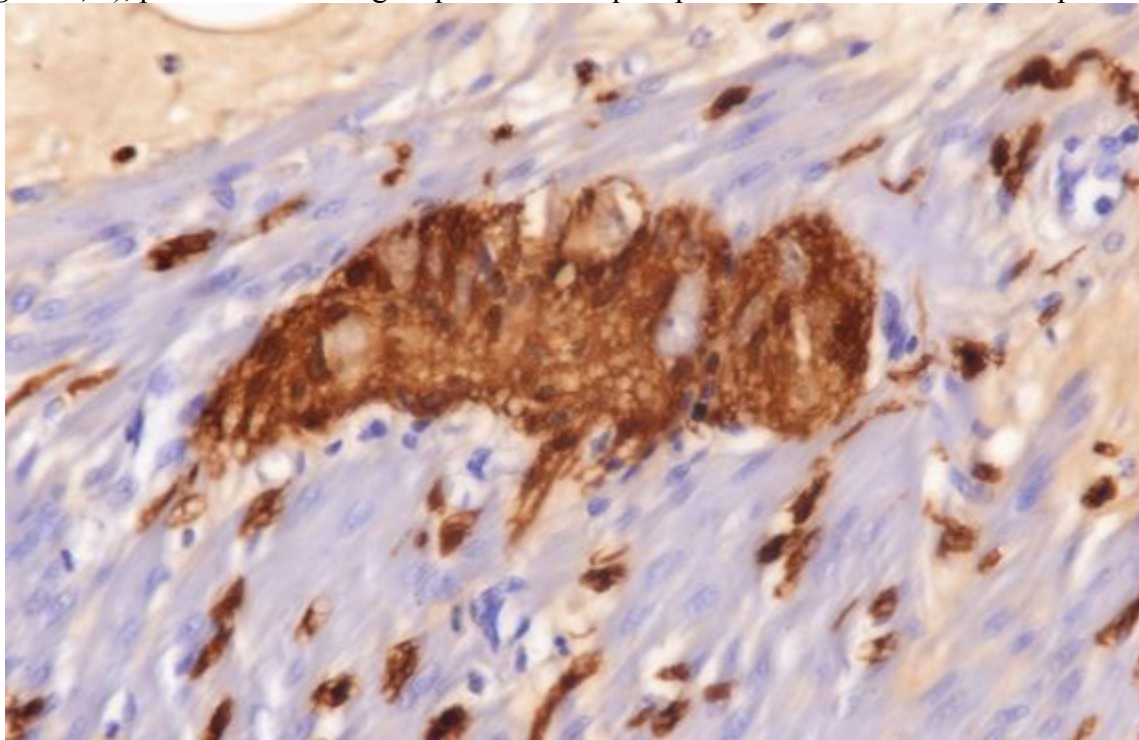
Studiul efectuat a fost de tip analitic prospectiv, observațional descriptiv, a cuprins un număr de 52 de pacienți diagnosticați cu adenocarcinom colorectal, selectați pe o perioadă de doi ani (2015-2016). Pentru a evita bias-ul, în acest studiu am inclus pacienții în mod consecutiv.

Cazuistica analizată a provenit de la pacienți, care au fost internați în Clinica de Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență (SCJU) Craiova, unde s-a ridicat suspiciunea de formațiune tumorală malignă la nivel colorectal, în urma explorărilor clinice și paraclinice efectuate. Ulterior, acești pacienți au fost supuși rezecției chirurgicale a unui segment colorectal, în Clinica de Chirurgie a aceluiași spital. Materialul biologic, prelevat în urma aplicării terapiei chirurgicale, a

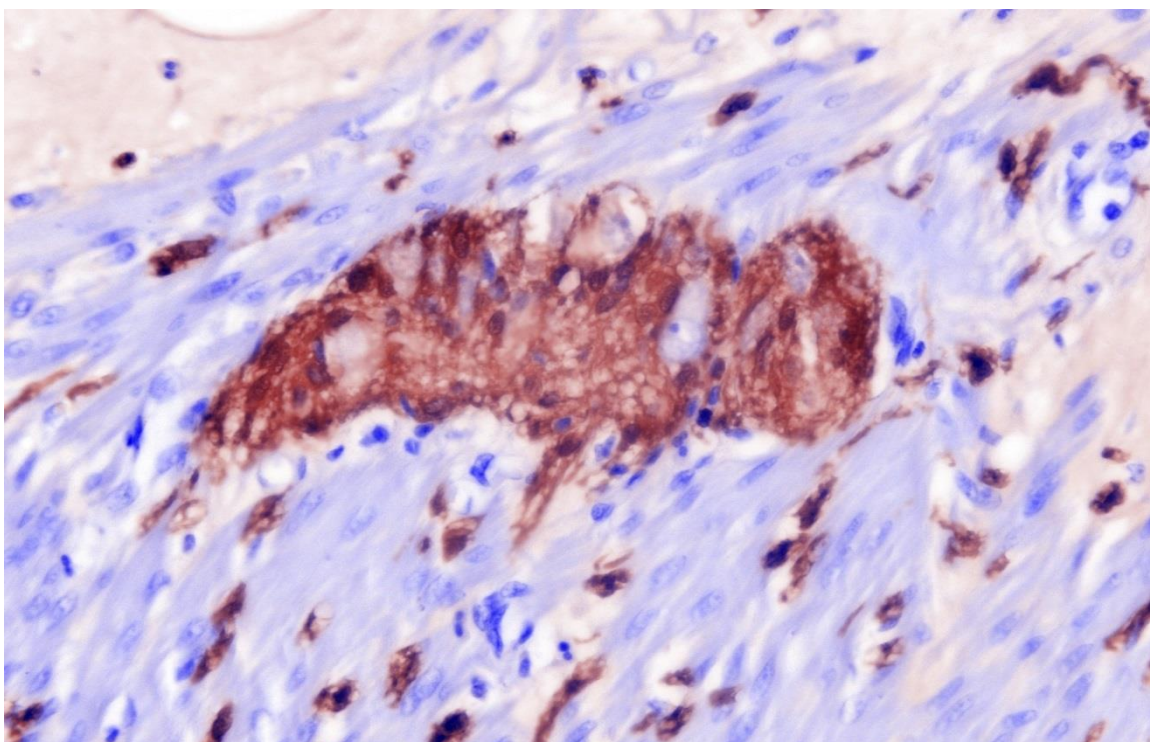
fost imediat pus în soluție fixatoare de formol 10% și, ulterior a fost trimis către Laboratorul de Anatomie Patologică al SCJU Craiova, unde a fost examinat inițial macroscopic, apoi a fost supus tehnicilor de prelucrare, în vederea analizei microscopice. Fragmente de material histologic au fost prelucrate în continuare în „Centrul pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie” al Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, unde s-a realizat studiul imunohistochimic.

Pentru achiziția și analiza imagistică computerizată, am utilizat metoda de microscopie optică și metoda de microscopie multispectrală.

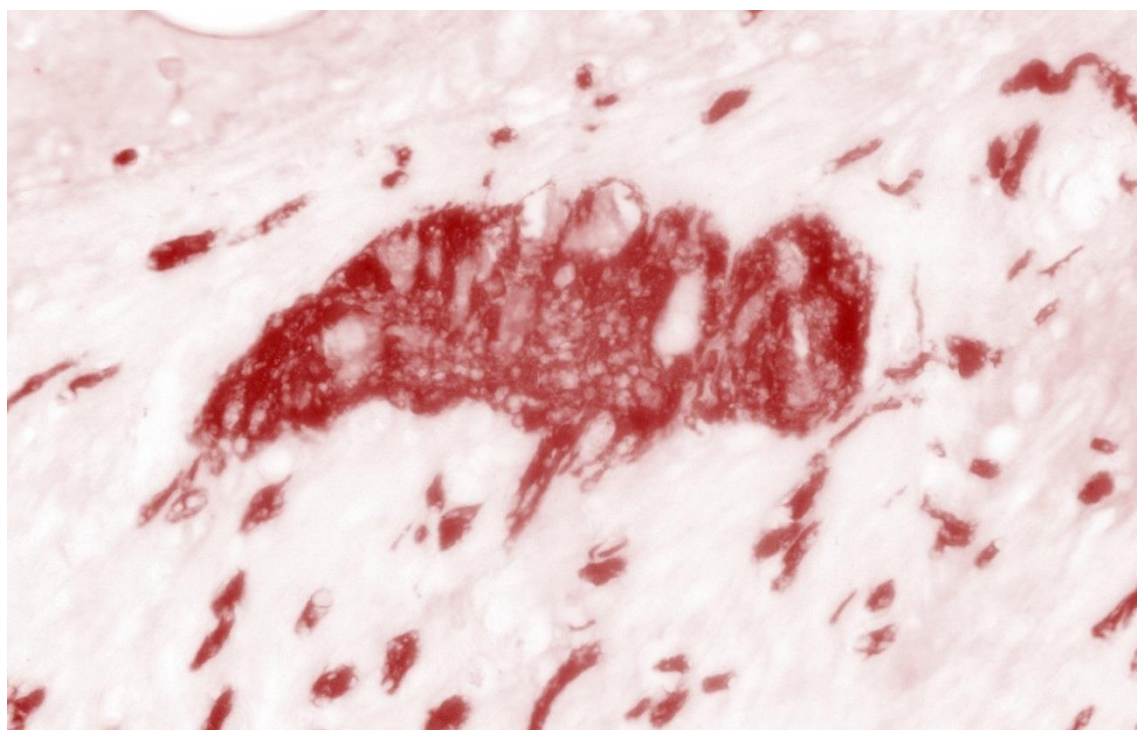
Pentru prima dată în literatură, am realizat studiul remodelării celulelor enterice gliale, precum și studiul infiltratului leucocitar intratumoral prin tehnica microscopiei multispectrale. Aceasta se bazează pe capacitatea camerei multispectrale de a transforma o imagine, obținută prin microscopia optică, într-un compus spectral și apoi, pe obținerea de imagini separate pentru fiecare spectru de culoare din compusul spectral realizat de cameră, cu ajutorul softului mai sus menționat. Acest proces este evidențiat în figurile următoare, unde, inițial, avem o imagine prin microscopia optică a unui ganglion din plexul nervos Auerbach (**Figura 1**), ulterior este redată imaginea obținută prin compusul spectral, realizat de camera multispectrală (**Figura 2**), pentru ca, în cele din urmă, să avem imaginile spectrale nemixate monocromatice, pentru fiecare culoare în parte (**Figura 3, 4**), pentru fiecare imagine prin microscopia optică creându-se o “bibliotecă” spectrală.



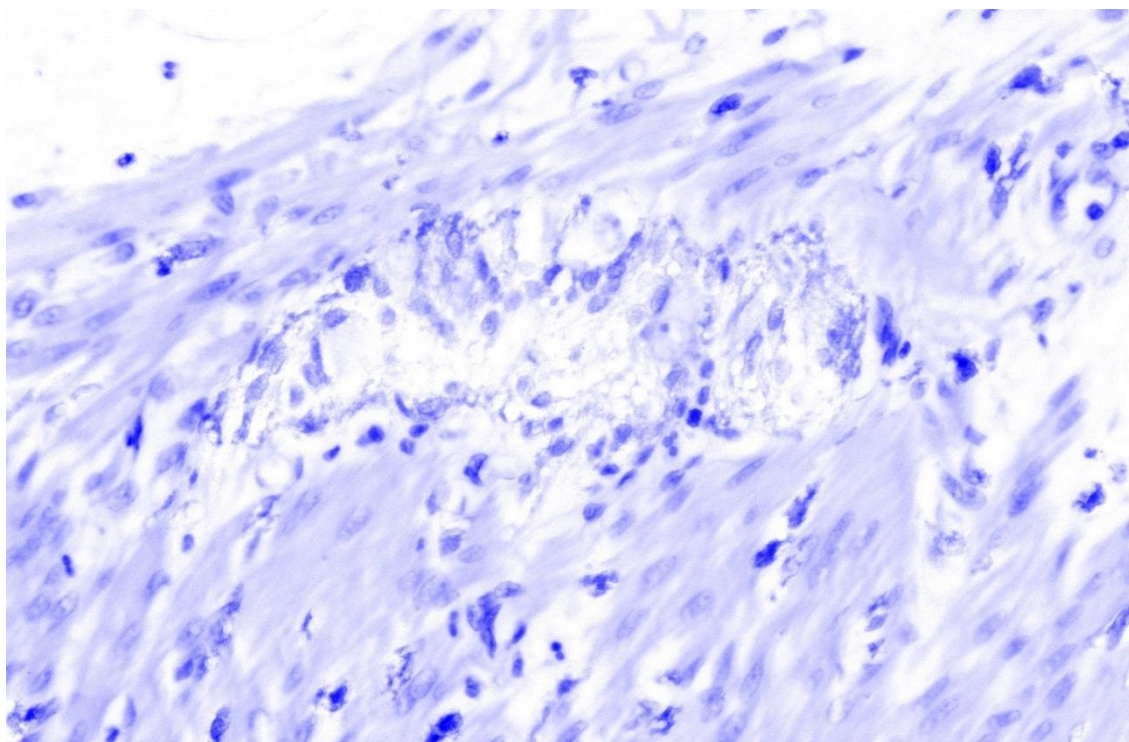
*Figura 1. Imaginea unui ganglion din plexul Auerbach, în microscopia optică, imunomarkaj S100, 40x.*



*Figura 2. Imagine compusă spectral; se văd mixate culorile: albastru pentru nuclei și maro pentru antigenele țintă, care identifică elementele nervoase (proteina S100), 40x.*



*Figura 3. Imagine nemixată pentru spectrul de culoare maro. Se observă numai culoarea pentru antigenele țintă, care identifică elementele nervoase (proteina S100), 40x.*



*Figura 4. Imagine nemixată pentru spectrul de culoare albastru. Se observă numai culoarea pentru nucleii, 40x.*

Principalii parametri au fost calculați cu ajutorul softului ImagePro Plus AMS 7 și au fost reprezentați de aria și densitatea optică integrată a semnalului de culoare, care a fost selectat. Atât pentru acești parametri, cât și pentru indicele de proliferare, s-au obținut date numerice, care au fost analizate cu ajutorul softului Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) și, după reprezentarea grafică, au fost exportate în softul SPSS (IBM SPSS Statistics, Versiunea 20.0), unde, mai întâi, au fost calculate media și deviația standard pentru fiecare grup, apoi a continuat analiza statistică.

## **Rezultate**

### **Evaluarea celulelor enterice gliale, care au exprimat GFAP din sistemul nervos enteric.**

Aria procentuală a țesutului nervos total, calculat cu ajutorul imunomarkerului S100, a fost în medie de  $0.121296 \pm 0.079121\%/mm^2$ , în timp ce aria procentuală a celulelor enterice gliale, calculată cu ajutorul imunomarkerului GFAP, a fost în medie de  $0.003056 \pm 0.001485\%/mm^2$ , ceea ce a însemnat un procent al celulelor enterice gliale de 2.52% din țesutul nervos total.

Subîmpărțind aria ocupată de celulele enterice gliale, evaluate cu imunomarkerul GFAP, în plexuri, am observat că aria procentuală a enterogliilor plexului nervos Meissner a fost de  $0.00013 \pm 0.000101\%/mm^2$ , aria procentuală a enterogliilor plexului nervos Auerbach a fost de  $0.002237 \pm 0.001562\%/mm^2$ , iar aria procentuală a enterogliilor din alte filete nervoase multiaxonale cu diametru mai mare de 20  $\mu m$  a fost de  $0.001074 \pm 0.000677\%/mm^2$ , aria

procentuală a enterogliilor din plexul nervos Auerbach fiind mai mare decât ariile procentuale din celelalte două categorii.

### **Evaluarea infiltratului leucocitar intratumoral**

Infiltratul leucocitar intratumoral a fost evaluat numai intraepitelial, nefiind luat în considerare infiltratul leucocitar intratumoral din stromă. Imunohistochimic, infiltratul leucocitar intratumoral a fost evaluat utilizând imunomarkerul CD45 (CLA – common leukocyte antigen), care identifică toate leucocitele, calculând pentru acesta atât aria semnalului, dar și densitatea optică integrată (IOD) în toate cele trei stadii de diferențiere ale CCR, cu ajutorul microscopiei multispectrale. Am constatat o creștere graduală atât a ariei cât și a densității optice integrate – IOD, de la adenocarcinomul colorectal bine diferențiat ( $2104.296 \pm 826.0828 \mu\text{m}^2$  pentru arie și  $259863.0316 \pm 106263.5552$  pentru IOD) la adenocarcinomul colorectal moderat diferențiat ( $4450.312 \pm 1328 \mu\text{m}^2$  pentru arie și  $523583.331 \pm 151044.9749$  pentru IOD), respectiv la adenocarcinomul colorectal slab diferențiat ( $7693.812 \pm 1840.834 \mu\text{m}^2$  pentru arie și  $946815.1146 \pm 236017.7378$  pentru IOD).

### **Evaluarea proliferării celulelor tumorale**

Activitatea proliferativă a carcinomului colorectal, pentru pacienții incluși în studiul nostru, a fost evaluată cu ajutorul anticorpului monoclonal Ki67, calculându-se pentru fiecare pacient în parte indexul de proliferare tumorală, exprimat în procente. Am constatat că în cazul pacienților diagnosticați cu adenocarcinom colorectal bine diferențiat (G1), activitatea proliferativă tumorală a fost de  $25.9381 \pm 13.5667 \%$ , în timp ce în cazul pacienților cu adenocarcinom colorectal moderat diferențiat, activitatea proliferativă tumorală a înregistrat o rată de  $44.2435 \pm 16.9495 \%$ , iar în cazul pacienților diagnosticați cu adenocarcinom colorectal slab diferențiat, activitatea proliferativă tumorală a avut cea mai mare rată de  $45.2962 \pm 29.2526\%$ .

### **Corelații între parametrii evaluați la pacienții incluși în studiu**

În ceea ce privește corelațiile între aria celulelor enterice gliale din întregul lot de pacienți incluși în studiu și activitatea proliferativă tumorală s-a înregistrat o corelație inversă globală la limită ( $r = -0.438$ ), în timp ce, între aria celulelor enterice gliale din întregul lot de pacienți incluși în studiu și infiltratul leucocitar tumoral s-a înregistrat o variație inversă globală înaltă ( $r = -0.701$ ). De asemenea, între aria celulelor enterice gliale din întregul lot de pacienți incluși în studiu și expresia adrenoreceptorilor  $\beta 2$  s-a înregistrat o corelație inversă înaltă ( $r = -0.734$ ).

### **Concluzii**

1. Cancerul colorectal este al treilea cel mai frecvent diagnosticat tip de cancer în lume și, de asemenea, a patra cauză principală de deces la nivel mondial.
2. Natura exactă a transformării neoplazice colorectale, dar și progresia și metastazarea tumorală nu sunt pe deplin elucidate la ora actuală, impunându-se noi cercetări în domeniu.
3. Celulele enterice gliale, prin intermediul factorilor solubili pe care îi sintetizează, joacă un rol important în menținerea barierei intestinale și în controlul proliferării celulare, de unde se poate deduce faptul că este afectată integritatea lor în adenocarcinomul colorectal, așa cum a fost raportată în studiul nostru și ar constitui un element favorizant al proliferării și metastazării celulare.
4. Procentul celulelor enterice gliale a fost de 2.52% din țesutul nervos enteric total, în cazul pacienților incluși în studiul nostru.



5. Evaluarea celulelor enterice gliale în diferitele stadii de diferențiere tumorală ale cancerului colorectal a evidențiat faptul că densitatea acestor elemente nervoase este mai mare în tumorile colorectale bine diferențiate, spre deosebire de tumorile colorectale moderat diferențiate și tumorile colorectale slab diferențiate.
6. Analizând infiltratul leucocitar intratumoral, am constatat o creștere graduală atât a ariei cât și a densității optice integrate, de la tumorile colorectale bine diferențiate la tumorile colorectale moderat diferențiate, respectiv la tumorile colorectale slab diferențiate.
7. S-a observat că indexul de proliferare tumorală crește în medie cu gradul tumoral.
8. În tumorile colorectale moderat diferențiate s-a înregistrat o corelație inversă înaltă, atât între celulele enterice gliale și activitatea proliferativă tumorală, pe de o parte, cât și între celulele enterice gliale și infiltratul leucocitar intratumoral, pe de altă parte.
9. În tumorile colorectale slab diferențiate, a fost înregistrată o corelație inversă la limită între celulele enterice gliale și activitatea proliferativă tumorală și o corelație inversă înalt semnificativă între celulele enterice gliale și infiltratul leucocitar intratumoral.
10. În ceea ce privește corelațiile între aria celulelor enterice gliale din întregul lot de pacienți inclus în studiu și activitatea proliferativă tumorală, s-a înregistrat o corelație inversă globală la limită, în timp ce între aria celulelor enterice gliale din întregul lot de pacienți incluși în studiu și infiltratul leucocitar tumoral s-a înregistrat o corelație inversă globală înalt semnificativă.

Concluzia finală este că scăderea densității celulelor enterice gliale în cancerul colorectal cu diferențierea tumorală, dar și variația inversă a acestora cu activitatea proliferativă tumorală și cu infiltratul leucocitar intratumoral poate servi ca factor de prognostic negativ în acest tip de cancer. Totuși, rolul jucat de celulele enterice gliale în cancerul colorectal rămâne indirect și studii ulterioare sunt necesare pentru a confirma rezultatele cercetării noastre.

## Bibliografie

- [1]. Giovannucci EL, Keum N. Epidemiology of Colorectal Cancer. Chapter 12: Epidemiology of Colorectal Cancer. In: Loda M, Mucci LA, Mittelstadt ML, Hemelrijck MV, Cotter MB (eds.) Pathology and Epidemiology of Cancer. Springer International Publishing Switzerland, 2017, 391 – 409.
- [2]. Gulbransen BD. Enteric glia. In: Verkhratsky A, Parpura V (eds). Colloquium series on neuroglia in biology and medicine: from physiology to disease. Morgan & Claypool Life Sciences, 2014, 1(2):1–70.
- [3]. Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Nov;9(11):625-32.
- [4]. Matteoli G. Enteric glial cells: new players in mucosal defence against bacteria? *Gut.* 2011 Apr;60(4):429-30.
- [5]. Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, De Giorgio R. Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology.* 2014 Dec;147(6):1230-7.
- [6]. Van Landeghem L, Mahé MM, Teusan R, Léger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M. Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics.* 2009;10:507.

- [7]. von Boyen G, Steinkamp M. The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biol.* 2010; 6(4):231-6.
- [8]. Yu YB, Li YQ. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(32):11273-80.
- [9]. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2101-2114.e5.
- [10]. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2516-25.
- [11]. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1016-22.
- [12]. Janakiram NB, Rao CV. The role of inflammation in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;816:25-52.
- [13]. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol.* 2016 Mar;17(3):230-40.