

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT

INTERRELAȚII NEURO-NEOPLAZICE
ÎN ADENOCARCINOMUL
COLORECTAL

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR . CRISTIN CONSTANTIN VERE

STUDENT-DOCTORAND:
GEORGICĂ COSTINEL TÂRTEA

CRAIOVA
2017

CUPRINS

INTRODUCERE	3
Stadiul cunoașterii	3
Contribuții proprii	4
Scopul și obiectivele cercetării.....	4
Material și metode.....	5
REZULTATE	5
Expresia receptorilor B2A	5
Expresia receptorilor M3 muscarinici	7
Expresia receptorilor TrkA pentru neurotrofine.....	7
Modificările sistemului nervos enteric în adenocarcinomul colorectal	7
Concluzii	8
Referințe	9

Cuvinte cheie: adenocarcinom colorectal, receptori beta 2 adrenergici, receptori M3 muscarinici, receptori TrkA pentru neurotrofine, sistem nervos enteric

INTRODUCERE

Cancerul colorectal rămâne și la ora actuală una dintre marile probleme de sănătate publică, fiind o neoplazie frecventă a cărei incidență și prevalență se află pe o direcție ascendentă la nivel mondial.

Am ales această temă întrucât, pe de o parte, cancerul colorectal continuă să rămână una dintre principalele neoplazii atât ca incidență cât și ca morbiditate și mortalitate în rândul populației din întreaga lume, iar pe de altă parte la ora actuală se dorește a se schimba modelul clasic de boală cu modelul de boală biopsihosocială care include o abordare mai complexă atât a determinismului fiziopatologic al bolilor cât și a conduitei diagnostice și terapeutice. Interacțiunea dintre celulele neoplazice, celulele endoteliului vascular, matrixul extracelular, celulele sistemului imun dar și alte elemente cum ar fi elementele nervoase, a beneficiat de studii ample în ultimii ani pentru dezvoltarea de noi terapii țintite molecular (ex: terapiile antiangiogenice). Cu toate acestea, mecanismele care sunt implicate în patogenia și evoluția neoplasmului colorectal se află și la ora actuală departe de a fi înțelese pe deplin.

Acest studiu este structurat în două mari părți. În prima parte am analizat literatura de specialitate cu privire, în special, la factorii de risc pentru cancerul colorectal, principalele mecanisme implicate în carcinogeneza colorectală, căile de semnalizare intracelulară implicate de asemenea în carcinogeneza colorectală, dar și câteva informații despre sistemul nervos enteric al tubului digestiv și informații despre anumiți receptori pentru neurotransmițători, cum ar fi receptorii beta 2 adrenergici pentru catecolamine, receptorii M3 muscarinici pentru acetilcolină, dar și receptorii TrkA pentru neurotrofine.

În cea de-a doua parte am realizat studiul propriu-zis, în care am studiat pe de o parte expresia receptorilor mai sus amintiți în epiteliul tumoral iar pe de altă parte am analizat modificările sistemului nervos enteric în adenocarcinomul colorectal. Am realizat de asemenea corelații între caracteristicile clinicopatologie și rezultatele obținute în urma acestui studiu, ca în final să închei această teză cu discuții și concluzii.

Stadiul cunoașterii

Conform Organizației Mondiale a Sănătății în anul 2012, în întreaga lume, cancerul colorectal (CCR) reprezenta aproximativ 10% din totalul cazurilor de cancer la bărbați, situându-se pe locul al doilea pentru această categorie, și 9.2% din totalul cazurilor de cancer la femei, în acest caz situându-se pe locul al treilea [1].

La 1 ianuarie 2016 în Statele Unite ale Americii trăiau 1.4 milioane de persoane diagnosticate cu CCR, 95% din pacienții supraviețuitori cu CCR având peste 60 de ani (1 391 440), în timp ce aproximativ 5% din pacienți (60 610) au avut sub 60 de ani [2]. De asemenea, pentru anul 2016 au fost prevăzute a fi diagnosticate 134 490

de cazuri noi de CCR, vârsta medie de diagnostic fiind de 66 de ani pentru bărbați și 70 de ani pentru femei [2].

Cancerul colorectal are numeroși factori de risc, mulți dintre ei suprapunându-se peste un teren genetic predispus [3]. Mai mult decât atât, CCR reprezintă un model de carcinogeneză multistadială caracterizată prin apariția alterărilor genetice succesive, responsabile de transformarea unei celule colice normale în celulă canceroasă [3]. Numeroase studii ale alterărilor genetice, somatice și constituționale au permis indentificarea a numeroase căi de carcinogeneză colorectală [3].

Carcinogeneza colorectală este un proces complex în care tranziția epiteliu colonic normal – adenom – carcinom cu fenotip invaziv se datorează în mod esențial alterărilor genetice succesive care au loc în liniile germinale, alterări ce pot fi moștenite sau survenite de novo. Carcinogeneza colorectală cuprinde 3 mecanisme importante: instabilitatea cromozomială (aproximativ 85% din cazurile cu CCR), hipermetilarea citozinelor din insulele CpG (aproximativ 25% din cazurile cu CCR) și instabilitatea microsateleliților (aproximativ 15% din cazurile cu CCR) [4-8].

Studii recente au confirmat ca alterarea genetică contribuie la carcinogeneza colorectală în principal prin 5 căi de semnalizare intracelulară. Acestea sunt: TGF- β , Wnt/APC/ β -catenina, p53, RAS/RAF/MAPK și PI3K/AKT/mTOR [9].

În mod convențional adenocarcinoamele sunt caracterizate prin formarea de glande, astfel că avem adenocarcinom bine diferențiat dacă >95% din tumoră conține glande, adenocarcinom moderat diferențiat dacă există glade în proporție de 50-95% și slab diferențiat dacă avem glande formate într-o proporție mai mică de 50%. Adenocarcinomul moderat diferențiat este cel mai diagnosticat (aproximativ 70%), în timp ce adenocarcinomul slab diferențiat este diagnosticat în proporție de aproximativ 20% iar cel bine diferențiat în proporție de 10% [10].

Receptorii beta adrenergici sunt receptori cuplați cu proteinele G. Activarea lor inițiază o mulțime de căi de semnalizare intracelulară care includ adenilat ciclaza, 3',5' adenil monofosfat ciclic - cAMP, protein kinaza A – PKA, activarea cascadei acidului arahidonic, dar și alte căi ce pot fi implicate în carcinogeneza colorectală [11,12].

Intuiți pentru prima dată de Dale în 1914, receptorii muscarinici s-au dovedit a fi implicați în carcinogeneză la diferite niveluri [13-16].

În ultimii 20 de ani, factorul de creștere nervoasă (NGF) și receptorii pentru el, TrkA și p75NTR, au fost analizați într-o mulțime de cancere printre care și neoplasmul colorectal iar aceste studii au sugerat că acestea ar putea fi noi ținte moleculare în terapiile anticanceroase [17].

Contribuții proprii

Scopul și obiectivele cercetării

Lucrarea de față își propune să facă o analiză descriptivă a substratului fiziopatologic din carcinogeneza colorectală la nivelul interrelațiilor neuro-neoplazice. Astfel am delimitat următoarele obiective:

- ❖ Realizarea unui studiu analitic, observațional descriptiv, pe o perioadă de doi ani în mod prospectiv, pentru identificarea unor modificări în cadrul sistemului nervos enteric cât și ale unor receptori pentru neurotransmițătorii acestui sistem, exprimați de celulele neoplasmului colorectal, modificări ce pot fi corelate cu aspecte ale patogeniei și carcinogenezei colorectale;
- ❖ Identificarea și definirea parametrilor morfologici ce caracterizează sistemul nervos enteric, în scopul realizării unor corelații cu trăsăturile clinico-patologice ale neoplasmului colorectal;
- ❖ Evaluarea expresiei receptorilor beta-2 adrenergici pentru catecolamine, M3 muscarinici pentru acetilcolină și TrkA pentru neurotrofine, în adenocarcinomul colorectal și stabilirea unor corelații cu anumite caracteristici clinico-patologice ale pacienților incluși în studiu.

Material și metode

Am realizat un *studiu prospectiv* în perioada octombrie 2014 – decembrie 2016, de tip *analitic observațional*, în care am inclus în total 60 de pacienți. Pacienții au fost incluși în studiu *consecutiv* pentru a se evita bias-ul.

Pacienții au fost inițial diagnosticați în Clinica Medicală I - Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, în baza unor criterii de diagnostic, cu suspiciune de tumoră malignă situată la nivelul unuia din segmentele colorectale. Pacienților li s-a aplicat apoi tratamentul chirurgical cu tentă curativă în Clinica de Chirurgie I a spitalului mai sus menționat, iar din piesa de rezecție chirurgicală au fost selecționate fragmente de țesut tumoral care au făcut obiectul acestui studiu.

Materialul biologic utilizat pentru studiile imunohistochimice din această teză, după diagnosticul histopatologic efectuat în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică, a fost procesat și analizat prin metode imunohistochimice în cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova.

După achiziția imaginilor, au fost definite regiuni de interes (ROI – regions of interest) pe secțiunile colorate cu DAB, pe baza aceluiași profil de culoare RGB în mod constant, iar aceste regiuni de interes (ROI) au fost utilizate pentru a calcula aria semnalului și densitatea optică integrată (IOD – integrated optical density) cu ajutorul software-ului Image-Pro Plus AMS. Apoi, aceste date au fost exportate și reprezentate grafic în Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) și analizate utilizând software-ul SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 20.0).

REZULTATE

Expresia receptorilor B2A

Pentru prima dată în literatura de specialitate, cu ajutorul tehnicii microscopiei multispectrale nemixate am efectuat caracterizarea expresiei morfologice a receptorilor B2A.

Pe lângă o reacție citoplasmatică slab difuză în mucoasa normală colonică, receptorii B2A au prezentat un pattern granular în citoplasma enterocitelor, deasupra nucleilor, spre partea luminală a epitelului de acoperire. În celulele caliciforme,

semnalul a fost localizat cel mai frecvent sub nucleu. Celulele stromale au arătat, de asemenea, un pattern granular în compartimentul citoplasmatic (Figura 1.A-D).

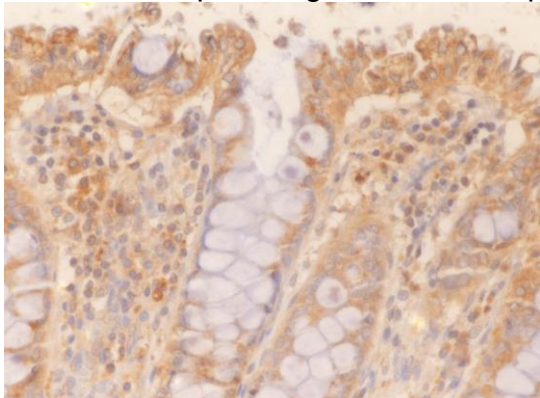


Figura 1.A. Exemplu de imagini seriate spectrale nemixate a unei secțiuni. A – imunomarcare pentru receptori B2A cu DAB, profil de culoare RGB, X400.

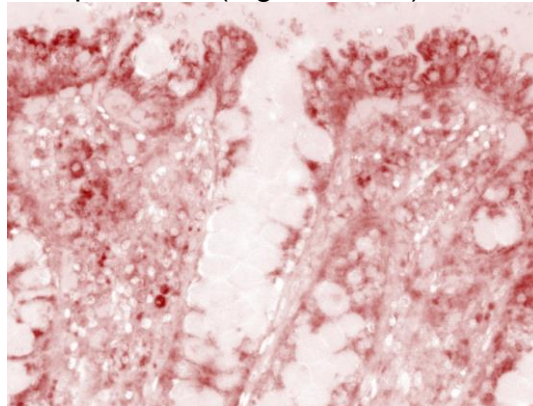


Figura 1.C. Imagine nemixată semnal pur DAB pentru receptori B2A redat în maro, X400.

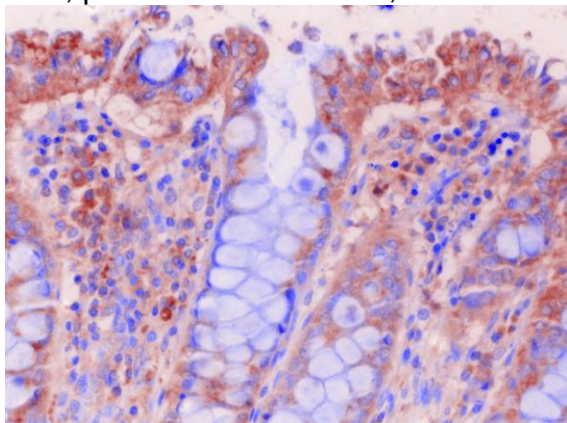


Figura 1.B. Imagine mixată, culorile albastru și maro suprapuse; imagine contrastată cu hematoxilină-eozină, X400.

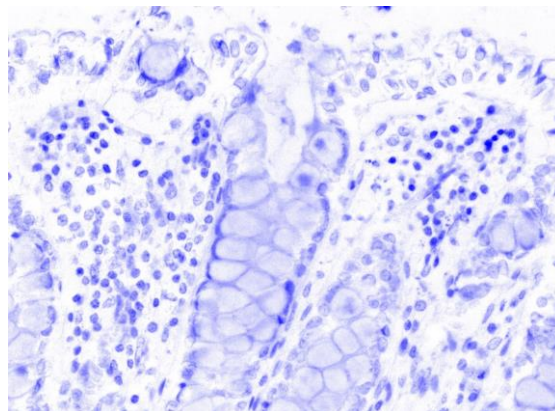


Figura 1.D. Exemplu de imagini seriate spectrale nemixate a unei secțiuni. D – imagine nemixată semnal pur hematoxilină-eozină redat în albastru, X400.

În adenocarcinoamele bine diferențiate, cea mai mare parte a semnalului a fost încă localizată spre partea luminală a celulelor tumorale, deși ocazional s-a identificat un pattern granular al semnalului în polul bazal al celulelor.

În adenocarcinoamele moderat diferențiate semnalul a părut să-și piardă aspectul granular, semnalul devenind mai difuz și mai intens în celulele epiteliale.

În adenocarcinoamele slab diferențiate, intensitatea semnalului a crescut în citoplasma celulelor tumorale iar pe un fond în general intens s-au putut identifica punți de semnal foarte intense în jurul nucleilor.

În ceea ce privește expresia receptorilor B2A în țesutul total aparținând fiecărui pacient inclus în studiu, am observat că a existat o creștere graduală atât a ariei cât și a IOD de la țesutul normal la diferitele grade de diferențiere ale adenocarcinomului colorectal, G1, G2 respectiv G3.

Am observat o diferență statistic semnificativă la analiza varianței ANOVA urmată de testul post-hoc Bonfferoni între expresia semnalului din țesutul normal colonic și expresia semnalului din G2,G3 ($p=0.000$) și de altfel între G1 și G2, G3 ($p=0.000$) atât pentru arie cât și pentru IOD B2A.

Nu s-au evidențiat diferențe statistic semnificative între media ariei și IOD receptorilor B2A din stroma mucoasei colonice normale și diferitele grade de diferențiere ale adenocarcinomului colorectal.

Atât aria receptorilor B2A cât și IOD au fost corelate semnificativ statistic cu dimensiunea tumorii, invazia tumorală și metastazele în ganglionii limfatici regionali, în timp ce în privința sexului pacienților, localizarea tumorii și aspectul microscopic nu s-au evidențiat corelații semnificativ statistice. În ceea ce privește vârsta pacienților, nu a fost o diferență semnificativ statistică pentru aria B2A între grupul de pacienți cu vârsta de până în 60 de ani și grupul de pacienți cu vârsta peste acest cut-off, în timp ce pentru IOD B2A a existat o diferență statistic semnificativă ($p=0.018$).

Expresia receptorilor M3 muscarinici

Acest tip de receptori pentru acetilcolină au fost exprimați atât în țesutul colonic normal cât și în diferitele grade de diferențiere tumorală. S-a evidențiat o creștere atât a ariei cât și a IOD pentru acest tip de receptori cu gradingul tumoral.

Expresia receptorilor TrkA pentru neurotrofine

Acest tip de receptori pentru neurotrofine au fost exprimați atât în țesutul colonic normal cât și în diferitele grade de diferențiere tumorală, dar cu semnificativă reducere a semnalului în țesutul tumoral slab diferențiat.

Modificările sistemului nervos enteric în adenocarcinomul colorectal

Am analizat plexul submucos Messner, plexul mienteric Auerbach și plexurile nervoase intratumorale, ca de asemenea și fibrele nervoase multiaxonale mai mari de 20 μm , care nu au putut fi incluse nici în plexul Auerbach nici în plexul Messner prin studiul semnalului imunomarkerului S100.

Densitatea țesutului nervos total exprimată prin aria procentuală a înregistrat cele mai mici valori în tumorile G1 ($0.129\pm 0.052\%$) urmate de țesutul colonic normal ($0.184\pm 0.041\%$), G2 ($0.355\pm 0.131\%$) și G3 ($0.264\pm 0.172\%$).

Aria procentuală a plexului Auerbach a înregistrat o scădere netă de la țesutul colonic normal ($0.136\pm 0.039\%$) la G1 ($0.067\pm 0.043\%$), G2 ($0.094\pm 0.078\%$), cu un minimum înregistrat în G3 ($0.023\pm 0.040\%$).

Pe de altă parte, fasciculele nervoase de dimensiuni mari au arătat același pattern dar cu o creștere a ariei procentuale de la mucoasa colică normală ($0.013\pm 0.006\%$), la G1 ($0.052\pm 0.033\%$), G2 ($0.248\pm 0.087\%$) și G3 ($0.241\pm 0.146\%$).

Cu toate acestea, aria relativă a plexului Meissner a înregistrat aceeași scădere ca plexul Auerbach, de la maximum înregistrat în mucoasa colică normală ($0.034\pm 0.017\%$), la G1 ($0.009\pm 0.005\%$), G2 ($0.012\pm 0.013\%$), respectiv G3 ($0.002\pm 0.003\%$).

Concluzii

1. Adenocarcinomul colorectal continuă să rămână una dintre marile probleme de sănătate publică, fiind o neoplazie frecventă a cărei incidență și prevalență se află pe o direcție ascendentă la nivel mondial.
2. Mecanismele care sunt implicate în patogenia și evoluția neoplasmului colorectal se află și la ora actuală departe de a fi înțelese pe deplin.
3. În patogenia și evoluția neoplasmului colorectal, elementele nervoase din micromediul tumoral par să aibă un rol important.
4. Densitatea elementelor nervoase totale este mai crescută în adenocarcinoamele colorectale moderat și slab diferențiate comparativ cu cele bine diferențiate și mucoasa colică normală.
5. Odată cu scăderea diferențierii tumorale sau cu creșterea gradului tumoral am constatat o scădere a ariei procentuale, atât pentru plexul Auerbach cât și pentru plexul Meissner, iar pe de altă parte am observat o creștere a ariei procentuale a altor elemente nervoase care nu au putut fi încadrate nici în plexul Auerbach, nici în plexul Meissner.
6. Receptorii B2A au fost prezenți în celulele stromale cât și în nervii și ganglionii nervoși.
7. Pentru prima dată în literatura de specialitate, cu ajutorul tehnicii microscopiei multispectrale nemixate, am efectuat caracterizarea expresiei morfologice a receptorilor B2A în adenocarcinomul colorectal.
8. În ceea ce privește expresia receptorilor B2A în țesutul total aparținând fiecărui pacient inclus în studiu, am observat că a existat o creștere graduală atât a ariei cât și a IOD de la țesutul normal la diferitele grade de diferențiere ale adenocarcinomului colorectal, G1, G2 respectiv G3.
9. Expresia receptorilor B2A numai în epiteliul glandular a avut o creștere graduală asemenea expresiei receptorilor B2A în țesutul total de la țesutul colonic normal la G1, G2, respectiv G3
10. În medie nu a existat nicio diferență între semnalul receptorilor B2A din stroma diferitelor stadii de tumori și lotul martor.
11. Atât aria receptorilor B2A cât și IOD au fost corelate semnificativ statistic cu dimensiunea tumorii, invazia tumorală și metastazele în ganglionii limfatici regionali, în timp ce în privința sexului pacienților, localizarea tumorii și aspectul microscopic nu s-au evidențiat diferențe statistic semnificative.
12. În ceea ce privește vârsta pacienților, nu a fost o diferență statistic semnificativă pentru aria B2A între grupul de pacienți cu vârsta de până în 60 de ani și grupul de pacienți cu vârsta peste acest cut-off, în timp ce pentru IOD B2A a existat o diferență statistic semnificativă.
13. Am observat că există o corelație inversă, moderată până la puternică, între expresia receptorilor B2A în epiteliul tumoral și densitatea plexurilor Auerbach și Meissner odată cu gradul tumoral.
14. Deși elementele nervoase sunt componente ale stromei, nu a existat nicio corelație semnificativă între expresia B2A stromală sau totală și plexurile nervoase mai sus amintite.

15. Am observat că există o corelație pozitivă între expresia receptorilor B2A în țesutul normal peritumoral și genul feminin, grupul de vârstă peste 50 de ani, dimensiunea tumorii peste 5 cm, invazia tumorală T₃₋₄ și metastaza în ganglionii limfatici regionali N_{≥2}. În ceea ce privește localizarea tumorală nu există diferențe statistic semnificative.
16. Analizând expresia receptorilor B2A în țesutul normal peritumoral în funcție de gradul de diferențiere tumorală, am observat o diferență statistic semnificativă între expresia receptorilor B2A din G1, G2 și expresia acestor receptori din G3.
17. Receptorii M3 pentru acetilcolină și TrkA pentru neurotrofine au fost exprimați atât în țesutul colonic normal cât și în diferitele grade de diferențiere tumorală în probele biologice de la trei pacienți analizate în această teză.
18. Expresia receptorilor M3 a crescut odată cu gradingul tumoral.
19. Receptorii TrkA au înregistrat o creștere a expresiei numai în G1, respectiv G2 comparativ cu țesutul normal, în timp ce în țesutul tumoral slab diferențiat s-a înregistrat o semnificativă reducere a semnalului.

Referințe

- [1]. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359–E386.
- [2]. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jul; 66(4):271-89.
- [3]. Viguier J, Bourlier P, Karsenti D, de Calan L et Danquechin Dorval E. Cancer du côlon. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Gastro-entérologie*, 9-068-A-10, 2003, 1 - 18.
- [4]. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 28;20(4):943-56.
- [5]. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016 Mar;13(1):120-35.
- [6]. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, Medema JP, Kandimalla R. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1866(1):106-20.
- [7]. Sinicrope FA, Okamoto K, Kasi PM, Kawakami H. Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 May;14(5):651-8.
- [8]. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016 Aug;469(2):125-34.
- [9]. Tougeron D. Carcinogenese colorectale, donnees fondamentales. *EMC – Gastro-enterologie*, 2014; 9 (3): 1 – 15.

- [10]. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.
- [11]. Schuller HM. Beta-adrenergic signaling, a novel target for cancer therapy? *Oncotarget*. 2010 Nov;1(7):466-9.
- [12]. Cole SW, Sood AK. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 1;18(5):1201-6.
- [13]. Xie G, Cheng K, Shant J, Raufman JP. Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Apr;296(4):G755-63.
- [14]. Spindel ER. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(208):451-68.
- [15]. Peng Z, Heath J, Drachenberg C, Raufman JP, Xie G. Cholinergic muscarinic receptor activation augments murine intestinal epithelial cell proliferation and tumorigenesis. *BMC Cancer*. 2013 Apr 24;13:204.
- [16]. Haga T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2013;89(6):226-56.
- [17]. Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Friess H, Ceyhan GO. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1866(1):37-50.