

# **RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC AL PROIECTULUI**

- REZUMAT -

**Titlul proiectului:** *“Studiul imunogenomic al expresiei si rolului functional al unor molecule de adeziune celulara (CAM) asociate cancerului colorectal” ( COLOCAM )*

**Nr. contract:** 42-173/2008

**Etapa 2/2009:** *“Prelevarea si caracterizarea probelor biologice. Izolare celule din tesuturi si sange, examen histopatologic”*

**Perioada de desfasurare:** 28.02.2009 – 10.12.2009

## **1) OBIECTIVELE GENERALE ALE PROIECTULUI:**

- Analiza expresiei genice a unor CAM/TAA prin RT-PCR si corelarea profilului individual al expresiei genice cu expresia proteinei codificate, evaluata prin metode imunochimice (IHC, citometrie in flux), precum si cu gradul de proliferare a tumorii, dinamica ciclului celular si nivelul apoptozei, cu evolutia clinica a pacientilor;
- Modularea expresiei genice/proteice si rolului functional al CAM/TAA luate in studiu in liza celulelor tumorale colorectale.;
- Crearea unui model experimental in scopul validarii mecanismelor celulare si moleculare implicate in progresia tumorala si rezistenta la tratament al tumorilor colorectale utilizand pe linii celulare.

## **2) OBIECTIVELE ETAPEI DE EXECUTIE**

- a.** Examen colonoscopic, prelevare biopsica
- b.** Colectarea probelor biologice (sange, tesut) de la pacientii diagnosticati cu cancer colorectal
- c.** Initierea liniilor celulare din tumori colorectale
- d.** Cultivare linii celulare imortalizate din tumori colorectale

- e. Caracterizarea fenotipică a PBL izolate din sângele periferic
- f. Diseminare rezultate.
- g. Managementul proiectului.

### **3) REZUMATUL ETAPEI**

Scopul acestui proiect este de a implementa metodele de imunogenomică în studiul cancerului colorectal în scopul caracterizării expresiei genice/proteice a moleculelor de adeziune celulară, respectiv a antigenelor asociate tumoral (CAM/TAA) și implicării lor în reglarea interacției dintre celulele tumorale și sistemul imun al gazdei în vederea descifrării mecanismelor care guvernează sistemele biologice, ca și al optimizării prognosticului bolii.

- În cadrul prezentei etape s-a realizat următoarele activități:

- a. Examenul colonoscopic și prelevarea biopsic
- b. Colectarea probelor biologice (sânge, țesut) de la pacienții diagnosticați cu cancer colorectal
- c. Inițierea liniilor celulare din tumori colorectale și menținerea în cultură a liniilor celulare imortalizate din tumori colorectale
- d. Caracterizarea fenotipică a PBL izolate din sângele periferic

Carcinoamele colorectale apar între 60-70 ani, și mai puțin de 20%, sub 50 de ani; în această ultimă situație, ar trebui suspectată pre-existența unei colite ulcerative sau a unui sindrom polipozic. Se estimează că în 1996 s-au înregistrat 875.000 cazuri de cancer colorectal, ceea ce a reprezentat 8,5% din toate cancerele nou înregistrate. Se constată rate extrem de ridicate în țările dezvoltate din Europa, America de Nord și cea de Sud, Australia și Noua Zeelandă, și rate scăzute în țări din Africa, Asia și Polinezia. În ultima decadă a secolului 20 se consideră că incidența și mortalitatea au scăzut pe ansamblu, dar au crescut rapid în țări care au adoptat stilul de viață vestic. De asemenea se observă faptul că incidența crește cu vârsta, carcinoamele fiind rare înainte de 40 de ani, excepție făcând indivizii cu predispoziție genetică sau afecțiuni predispozante precum bolile inflamatorii intestinale.

Detecția precoce a cancerului colorectal este potențial asociată unei importante reduceri a mortalității legate de boală. Dezvoltarea într-un timp îndelungat precum și sensibilitatea diagnostică a colonoscopiei și a tranzitului baritat, justifică strategiile agresive de screening. De asemenea, unele abordări ale screening-ului încearcă să detecteze nu numai cancerul în faze precoce, ci și polipii neoplazici. Excizia endoscopică a acestor leziuni ar putea într-o oarecare măsură să prevină cancerul colorectal.

Studiul nostru care și-a propus analiza clinică și histopatologică a pieselor operatorii la 40 de pacienți internați în Spitalul Clinic "Sfântul Ioan", a scos în evidență următoarele particularități:

- Pacienții au obiceiuri alimentare care pot fi considerate promotori ai carcinogenezei colorectale. Problema care trebuie rezolvată ar fi aceea de creștere a ponderii profilaxiei primare, și anume a rolului medicului de familie în educația sanitară.
- Cele mai frecvente simptome prezente la internare au fost ocluzia intestinală, hemoragiile, mai ales cele macroscopice, și anemia, datorită hemoragiilor oculte.
- Nu am înregistrat anamnestic nici un caz cu sindrom ereditar diagnosticat, sau istoric familial de cancer colorectal sau polipoze.
- Preponderența afectare a pacienților de peste 61 ani (77,5%).
- Preponderența afectare a sexului feminin, spre deosebire de literatura de specialitate, în care cei mai afectați sunt bărbații.
- Aspectul macroscopic dominant a fost cel vegetant-infiltrativ (70%)
- Marginile de siguranță nu erau invadate tumoral (90%)
- Tipul histologic prezent la toate cazurile a fost adenocarcinomul.
- Numai 7 cazuri au avut aspect mucosecretant: două cazuri cu celule în inel cu pecete, și 5 cazuri cu mucus extracelular (carcinoame coloide). Raritatea primului tip de carcinom este conformă cu literatura de specialitate.
- Majoritatea cazurilor au fost în stadii de infiltrare avansate (T3, T4) (92.5%)
- Numai 10% din cazuri s-au prezentat cu metastază de la debutul bolii. Localizarea metastazei depinde și de topografia tumorii.
- Mai mult de 50% din cazuri au fost tumori moderat diferențiate, ceea ce demonstrează faptul că existența metastazelor, în momentul prezentării la medic, nu depinde de gradul de diferențiere, ci mai mult de stadiul tumoral.
- Rarele cazuri cu leziuni tumorale pe adenoame preexistente poate sugera, fie lipsa de investigare, fie localizarea înaltă a tumorii

Examinarea prin citometrie în flux a limfocitelor periferice utilizând unii anticorpi monoclonali poate completa datele clinice asupra stării de imunitate a pacientului cu cancer colorectal, stare ce influențează evoluția ulterioară a bolii. Citometria în flux reprezintă o abordare tehnică de mare complexitate, ce permite determinarea simultană a mai multor parametri fizici și chimici caracteristici unei singure celule aflate în mișcare într-un curent de lichid. Metoda permite caracterizarea pe baze morfologice și fenotipice a populațiilor celulare din sângele periferic (limfocite, monocite, granulocite, etc.). Imunofenotiparea urmărește stabilirea proporțiilor de seturi și subseturi limfocitare din sângele periferic.

Activitatile desfasurate au rezultat in realizarea unui lot de pacienti care au fost caracterizati d.p.v. histologic, precum si a unei colectii de tesuturi, limfocitesi seruri ce vor fi utilizate in etapele urmatoare. Prin realizarea culturilor celulare s-au creat modele experimentale in vitro pentru viitoarea validare a mecanismelor celulare si moleculare implicate in progresia tumorala si rezistenta la tratament a tumorilor colorectale.

### **Diseminare rezultate.**

1. C. HOTNOG, M. HIRT, L.I. BRASOVEANU, *Factori implicati in angiogeneza cancerului*, Studii si cercetari de Virusologie, Academia Romana, vol. 39 (1), pg. 13-25, 2009
2. L.I. BRASOVEANU, M. HIRT, C. HOTNOG, L. PUIU, G. ANTON, Stimuli modulation of apoptosis and proliferation through cell cycle phases in colon cancer cell lines, European Journal of Immunology, Vol. 39, Supliment 1:S pg. 197, „2nd European Congress of Immunology”, Berlin, Germany, sept. 2009
3. M. HIRT, C. HOTNOG, D. HOTNOG, L.I. BRASOVEANU, *Effect of stimuli treatment on cell signalling mechanisms associated to colorectal cell lines*, European Journal of Immunology, Vol. 39, Supliment 1:S pg. 529, „2nd European Congress of Immunology”, Berlin, Germany, sept. 2009
4. L.I. BRASOVEANU, C. HOTNOG, M. BOSTAN, M. HIRT, *Biomarkers of potential clinical use in the immunotherapy of colorectal cancers*, 34 th FEBS – Life’s Molecular Interactions, Late abstract book (pp. 104), Prague, Czech Republic, July 2009
5. L.I. BRASOVEANU, M. HIRT, G.G. MATEI, D. HOTNOG, M. BOSTAN, *Modulation of apoptosis and proliferation through cell cycle phases in colon cancer cell lines treated by cytotoxic drugs and/or natural compounds*, A XXXIX A Conferinta anuala de Imunologie, Calimanesti - Caciulata, sept. 2009, volum rez. pg. 46
6. M. HIRT, D. HOTNOG, G.G. MATEI, M. BOSTAN, L. PUIU, L.I. BRASOVEANU, *Cell signalling mechanisms induced in colon cancer cell lines by treatment with cytotoxic drugs and/or natural compounds*, A XXXIX A Conferinta anuala de Imunologie, Calimanesti - Caciulata, sept. 2009, volum rez. pg. 39-40