



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI

Rezumat al tezei de doctorat
**Modificări morfologice și moleculare specifice
neoplaziilor colorectale – implicații clinice**

Coordonator științific
Prof. Univ. Dr. Carmen Elena COTRUTZ

Doctorand,
Dr. Pavel ONOFREI

-2019-

Cuprins

Abrevieri	iii
Partea generală.Stadiul cunoașterii.....	1
Capitolul 1 Introducere	1
Capitolul 2 Aspecte morfologice și moleculare specifice segmentului colorectal.....	2
2.1 Aspecte anatomice ale segmentului colorectal.....	2
2.2 Aspecte de biologie celulară și moleculară ale segmentului colorectal.....	9
Capitolul 3 Carcinogeneza colorectală.....	17
3.1 Aspecte etiopatogenice ale cancerului colorectal.....	17
3.2 Aspecte clinice ale tumorilor segmentului colorectal.....	20
3.3 Clasificarea tumorilor colorectale.....	21
3.4 Mecanisme moleculare ale carcinogenezei colorectale.....	25
3.5 Diagnosticul, screeningul și tratamentul cancerului colorectal.....	29
Partea personală	45
Capitolul 4 Motivația și obiectivele studiului	45
Capitolul 5 Materiale și metode	49
Capitolul 6 Rezultate și discuții	53
6.1 Aspecte morfologice ale micromediului tisular specific tumorilor colorectale comparativ cu cele gastrice.....	53
6.2 Studiul imunohistochimic al expresiei ezrinei în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric.....	66
6.3 Studiul imunohistochimic al expresiei maspinei în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric.....	80

6.4 Studiul imunohistochimic al expresiei MMP-1, MMP-2 și MMP-9 în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric.....	96
Capitolul 7 Concluzii	118
Noțiuni de originalitate	121
Perspective deschise de teza de doctorat	121
Bibliografie	122

Această lucrare conține un număr de 56 imagini, 24 de tabele și 250 de referințe bibliografice. Rezumatul lucrării prezintă iconografie și referințe bibliografice selective, numerotate conform tezei în extenso.

Cuvinte cheie: ezrină, maspină, MMP-1, MMP-2, MMP-9, microscopie electronică

Introducere

În secolul XXI, una dintre problemele fundamentale ale medicinei, o constituie patologia neoplazică, cu diversitatea localizărilor, a tipurilor celulare implicate și a diferitelor moduri de manifestare (1). La nivel global, din totalul neoplaziilor, CCR este situat pe locul trei ca incidență și pe locul patru în ceea ce privește rata mortalității (2). Am considerat necesară inițierea unui studiu care să abordeze tumorile colorectale comparativ cu cele gastrice din perspectiva modificărilor ultrastructurale și moleculare pentru a contura fenotipul celular pentru această neoplazie.

Motivația și obiectivele studiului

Motivația studiului

Este cunoscut faptul că numeroase cercetări care au drept scop identificarea unor markeri moleculari specifici CCR evidențiază rolul esențial în tumorigeneza cu localizări diferite a unor proteine cum ar fi ezrina, maspina, metaloproteinazele și caracteristicile expresiei lor în diferitele compartimente subcelulare cu semnificație prognostică și pentru terapie motiv pentru care sunt avute în vedere de OMS ca potențiali biomarkeri diagnostici și prognostici pentru diferite tipuri de tumori maligne (8).

Având în vedere faptul că o serie de modificări morfologice nu pot fi relevate de microscopia fonică a cărei putere de rezoluție este limitată cât și pentru o caracterizare morfologică completă a microclimatului celular în care acționează moleculele studiate folosind microscopia electronică de transmisie alături de probe colorate cu H&E (care au fost utilizate pentru diagnosticul anatomopatologic) am efectuat un studiu ultrastructural comparativ între cancerul colorectal versus cancerul gastric (158).

Scopul studiului

- Identificarea contextului morfologic și a modificărilor la nivel ultrastructural în CCR comparativ cu tumorile gastrice și corelarea acestora cu aspectele evidențiate de microscopia fonică clasică în scopul evidențierii unor caracteristici morfologice ale tumorilor colorectale.
- Studiul IHC comparat al expresiei ezrinei în CCR respectiv CG, ca moleculă implicată în derularea unor căi

de semnalizare prin intermediul căroră este reglată proliferarea și migrarea celulelor tumorale.

- Studiul imunohistochimic comparat al expresiei maspinei în carcinoamele colorectale respectiv cele gastrice, moleculă implicată în realizarea fenotipului malign, în evoluția tumorală și în modularea angiogenezei peritumorale.

- Studiul imunohistochimic comparat al expresiei metaloproteinazelor 1,2,9 în carcinoamele colorectale respectiv cele gastrice considerate factori esențiali pentru invazivitate prin formarea unor centri de proliferare ai celulelor tumorale.

Obiectivele cercetării

- evaluarea contextului morfologic specific tumorilor avute în vedere cât și evidențierea comparativă pe baza aspectelor ultrastructurale a gradului de severitate a modificărilor morfologice de la nivelul acestora.

- corelarea rezultatelor studiului ultrastructural cu cele ale studiului imunohistochimic privind expresia moleculelor avute în vedere.

- identificarea unui pattern al expresiei acestor molecule în CCR și al existenței unor posibile corelații între expresia lor și implicarea în modificările unor căi de semnalizare cu rol în evoluția cancerului colorectal.

- evidențierea unor posibile corelații între expresia moleculelor avute în vedere și eficiența unor terapii specifice în cazul CCR.

- evidențierea existenței în cazul CCR a unui panel de markeri moleculari a căror expresie este interconectată și realizează specificul molecular al acestor tumori.

Materiale și metode

Materiale

Pentru prezentul studiu s-au recoltat fragmente de țesut tumoral și mucoasă normală pentru control de la un număr total de 172 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 49 și 75 ani, ce s-au prezentat pentru consult de specialitate în cadrul Institutului Regional de Oncologie Iași, datorită simptomatologiei specifice neoplaziilor tractului digestiv și care au fost diagnosticați clinic, imagistic și histopatologic cu: adenocarcinom colorectal moderat diferențiat – 92 cazuri: 17 cazuri T2N0M0, 54 cazuri T3N0M0 și 21 de cazuri cu tumori stadiile T3-4N0-2M0-1 și cu adenocarcinom gastric moderat diferențiat – 80 cazuri: 12 cazuri cu tumori T2N0M0, 50 cu tumori T3N0M0 și 18 cazuri cu tumori stadiile T3-4N0M0-1.

Atât fragmentele de țesut tumoral cât și cele de mucoasă gastrică și colorectală normală (perilezional, pentru a forma lotul martor) au fost recoltate prin biopsiere în cadrul examenului endoscopic digestiv (colonoscopie și endoscopie digestivă superioară) pentru care s-a folosit procesorul endoscopic PENTAX EPK-I5000, cu pensa de biopsie PENTAX, în cadrul serviciului de Gastroenterologie a Institutului Regional de Oncologie, Iași.

Înainte examenului endoscopic și a biopsierii s-a obținut consimțământul informat al fiecărui pacient în parte, conform cu legislația în vigoare. Diagnosticul anatomopatologic a fost stabilit în cadrul Serviciului de Anatomie Patologică și Prosectură a Institutului Regional de Oncologie, Iași.

Reactivi:

- Kitul EnVision®+ Dual Link System-HRP produs de firma Dako în Carpinteria, CA, USA pentru imunohistochimie;
- „Anti-Ezrin antibody produced in rabbit” produs de SIGMA-ALDRICH® pentru determinarea imunohistochimică a expresiei Ezrinei
- „Maspin mouse monoclonal antibody C-8” produs de Santa Cruz Biotechnology, Inc pentru determinarea imunohistochimică a expresiei Maspinei
- „MMP-1 antibody (3B6) mouse monoclonal IgG₁” produs de Santa Cruz Biotechnology, Inc pentru determinarea imunohistochimică a expresiei MMP-1
- „MMP-2 antibody (2C1) mouse monoclonal IgG₁” produs de Santa Cruz Biotechnology, Inc pentru determinarea imunohistochimică a expresiei MMP-2
- „MMP-9 antibody (2C3) mouse monoclonal IgG₁” produs de Santa Cruz Biotechnology, Inc pentru determinarea imunohistochimică a expresiei MMP-9
- „Liquid DAB+ Substrate Chromogen System” produs de Dako în Carpinteria, CA, USA – substrat cromogen

Metode

Din fragmentele tisulare recoltate de la pacienții incluși o parte au fost prelucrate prin tehnica *includerii la parafină*, după care au fost secționate și colorate cu *H&E* în vederea stabilirii diagnosticului anatomopatologic, alte fragmente au fost prelucrate prin *tehnica imunohistochimică* iar o serie de fragmente au fost prelucrate prin tehnica standard pentru *microscopie electronică de transmisie*. Asocierea dintre variabilele clinicopatologice (tipul țesutului, stadializarea tumorilor, diseminarea și prezența metastazelor) au fost analizate folosind teste de tip Chi pătrat și am comparat frecvența

de apariție a evenimentelor utilizând aplicația IBM SPSS versiunea 18.0 pentru Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

Rezultate și discuții

Aspecte morfologice ale micromediului tisular specific tumorilor colorectale comparativ cu cele gastrice

Rezultate

Electonmicroscopic, în cazul adenocarcinomului colorectal s-au obiectivat o serie de aspecte care vin în completarea celor identificate cu ajutorul microscopiei fotonice dar în același timp indică un grad mare de severitate al modificărilor morfologice:

- prezența la nivelul plasmalemei a unor discontinuități și a unor zone cu modificări ale structurii membranare normale și chiar invaginări; la nivelul unor celule se constată existența atât a unor desmozomi și hemidesmozomi cu structură normală, evindețiindu-se însă și o serie de joncțiuni de adezivitate cu structură modificată: dezorganizarea parțială a tonofilamentelor, uneori asociate în mănunchiuri cu diverse orientări în afara structurii plăcilor citoplasmatiche;

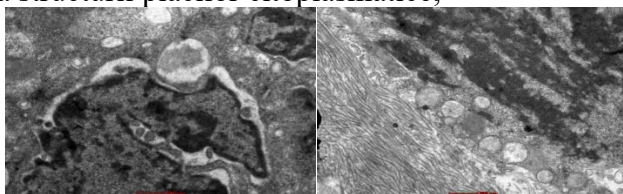


Fig. 6.1.5 Aspectul nucleului în CCR **Fig. 6.1.8** Organite, MEC în CCR

- liză citoplasmatică și vacuolizare perinucleară cu dezorganizarea structurii mitocondriilor evidențiindu-se destul de frecvent aspecte de degenerescență

mitocondrială avansată: balonizare mitocondrială, material amorf și electronodens în matrice și dispariția parțială/totală a creștelor mitocondriale;

- nucleii hipertrofiați, cu aspect edentat, având învelișul nuclear puternic plicaturat și cisterne perinucleare mult dilatate (Fig. 6.1.5);

- nucleoli compacți, electronodensi, uneori cu o structură dezorganizată, situați periferic spre lamina internă; în unele celule se pot observa doi nucleoli dispuși „în ochelari” – aspect caracteristic important pentru transformarea malignă avansată;

- la nivelul matricei extracelulare se observă dezorganizarea fibrelor de collagen și prezența unor fibroblaste mărite de volum, cu nucleii hipertrofici (Fig. 6.1.8);

Examinarea *electronomicroscopică* a probelor tisulare recoltate de la pacienții diagnosticați cu adenocarcinom gastric evidențiază modificări morfologice mai puțin importante în compartimentele subcelulare decât în cazul CCR și care vin în completarea celor relevate de microscopia fonică:

- dezorganizarea structurii morfologice a plasmalemei și a zonelor de cuplaj celular, cu o frecvență mai redusă decât în cazul examinării probelor tisulare recoltate din tumorile colorectale; în plus în aceste cazuri se observă unele zone în care lipsește arhitectonica normală a joncțiunilor impermeabile, având un aspect vacuolar;

- majoritatea nucleilor sunt măriți de volum și cu o cantitate redusă de cromatină nucleară dispusă într-un mod neregulat – aspect caracteristic transformărilor maligne; se observă nucleoli cu modificări atât al aspectului morfologic cât și numeric:

- degenerescenta mitocondrială este prezentă doar la nivelul câtorva mitocondrii care prezintă același material amorf în matrice ca și în cazul carcinomului colorectal, doar că aici se evidențiază și menținerea unor creste mitocondriale

Discuții

În ceea ce privește modificările ultrastructurale ale mitocondriilor menționate mai sus, unii cercetători au asociat modificările morfologice mitocondriale cu evoluția carcinogenezei pe care au comparat-o în unele cazuri cu mitondropatiile (162). Aceste aspecte ale modificărilor morfologice mitocondriale sunt asociate cu glicoliza aerobă cunoscută ca și efectul Warburg ce se referă la inhibarea funcționării lanțului respirator mitocondrial, afectarea fosforilării oxidative și ulterior dezvoltarea rezistenței la chimioterapie (164). Un alt aspect ultrastructural important îl reprezintă modificările suferite de nucleu. Remodelarea structurii nucleare la nivelul celulelor tumorale, sugerează un fenotip mai invaziv și conferă nucleului capacitate mai mare de deformare, favorizând invazia tumorală. În cazul tumorilor colorectale, studiile existente asociază aceste aspecte evidențiate în prezentul studiu cu modificarea expresiei laminei A și/sau C și indică un risc crescut de recurență (170), agresivitatea tumorilor și un prognostic nefavorabil (171). Nucleii eliptici sunt identificați în mucoasa carcinomului gastric bine diferențiat, pe când în cazul leziunilor slab diferențiate se observă nuclei sferici (172).

Dezorganizarea joncțiunilor observată în special în cazul tumorilor colorectale, reprezintă o modificare a acestor interacțiuni care conduce în final nu numai la

desprinderea celulelor tumorale de cele învecinate dar și la reorganizarea structurilor citoplasmatiche cu modificări ale proprietăților dinamice ale celulelor. Aceste modificări morfologice ale joncțiunilor celulare indică și modificări la nivelul unor căi de semnalizare implicate în cancerogeneză.

Studiul electronomicroscopic al tumorilor avute în vedere relevă prevalența crescută a unor modificări ultrastructurale importante, specifice celulelor tumorale, evidențiindu-se totodată severitatea modificărilor morfologice în cazul tumorilor colorectale comparativ cu cele de la nivel gastric în cazurile studiate. O parte din aceste modificări ultrastructurale au fost descrise în literatură în cele câteva studii existente, fără a fi analizate comparativ între cancerul colorectal și cel gastric și fără a se sublinia existența unor diferențe importante în ceea ce privește modificările ultrastructurale.

Studiul imunohistochimic al expresiei ezrinei în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric

Rezultate

Fragmentele de țesut recoltate de la cei 172 de pacienți diagnosticați anatomopatologic cu adenocarcinom colorectal și gastric, au fost prelucrate prin tehnica IHC și au fost examinate pentru a cuantifica expresia ezrinei cu ajutorul microscopului fonic Olympus BX40.

Discuții

Ezrina, membră a familiei de proteine ezrină/radixină/moesină leagă filamentele de actină (actina F) a citoscheletului la molecule din plasmalema având astfel rol în controlul actinei citoscheletale, în

derularea unor căi de semnalizare intercelulară implicate în proliferarea celulară, adezivitate celulară, motilitate, etc. și prin acestea în tumorigeneză, dezvoltare, invazie în cazul a numeroase tumori maligne cu diverse localizări (176).

Tabel 6.2.I Expresia ezrinei comparativ între localizarea colorectală și gastrică și stadiul TNM

LOCALIZARE		NR. CAZURI	EXPRESIA EZRINEI		
			MEMBRANAR	CITOPLASMATIC	NUCLEAR
COLORECTAL	Țes. Normal	92	++	-	+
	Țes. Tumoral	71 (77,2%) T2N0M0	68 +	68 ++	-
		T3N0M0	3 -	3 +++	-
		21 (22,8%) T3-4N0-2M0-1	-	+++	-
GASTRIC	Țesut Normal	80	++	-	-
	Țesut Tumoral	63 (77,5%) T2N0M0	-	55 ++	-
		T3N0M0	-	7 +++	-
		18 (22,5 %) T3-4N0-2M0-1	-	+++	-

Multiple studii până în momentul de față au demonstrat că modificarea expresiei ezrinei la nivel citoplasmatic comparativ cu cea predominant membranară în cazul țesutului normal este corelată cu un prognostic nefavorabil în cazul mai multor tipuri de tumori, inclusiv cele colorectale, însă fără a avea un mecanism de acțiune și interacțiune complet elucidat.

Rezultatele studiului au arătat că expresia ezrinei diferă în țesutul normal de cel tumoral; în țesutul normal al colonului am constatat că ezrina are o imunoreactivitate predominant membranară și rar nucleară, iar în țesutul tumoral imunoreactivitatea este moderat pozitivă (++) difuz citoplasmatic și slab pozitivă (+) membranar focal în cea mai mare parte a cazurilor studiate. Studiul imunohistochimic a mai evidențiat și faptul că în cadrul aceluiași stadiu TNM, la nivelul a 3 dintre tumori o expresie diferențiată față de restul, negativ (-) membranar și intens pozitivă (+++) la nivel

citoplasmatic (Tabel 6.2.I). Aceste rezultate sunt în acord cu datele din literatură care în mod similar au identificat marcajul ezrinei la nivelul joncțiunilor de tip celulă-celulă, deci membranar și o imunoreactivitate scăzută în zona bazală a epitelului în cazul țesutului colonic normal, pe când în adenocarcinomul colonic a fost obiectivată o localizare intens citoplasmatică (135). Comparativ cu rezultatele acestor studii, am constatat la cea mai mare parte din tumorile studiate și păstrarea unei IR slab pozitive (+) la nivel membranar cu importanță pentru prognosticul acestor tumori.

Studiul imunohistochimic al expresiei maspinei în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric

Rezultate

Prezentul studiu a avut în vedere expresia maspinei, o proteină implicată în organizarea zonelor de cuplaj celular, în motilitatea celulară, apoptoză și/sau angiogeneză pe care majoritatea studiilor o indică ca potențial biomarker de prognostic în cazul cancerului colorectal.

Tabel 6.3.I Expresia maspinei comparativ între localizarea colorectală și cea gastrică și stadiul TNM

LOCALIZARE		NR. CAZURI	EXPRESIA MASPINEI		
			MEMBRANAR	CITOPLASMATIC	NUCLEAR
COLORECTAL	Țes. Normal	92	-	++	+
	Țes. Tumoral	71 (77,2%) T2N0M0 T3N0M0	65 +	65 +++	65 ++
		21 (22,8%) T3-4N0-2M0-1	6 -	6 ++	6 +
			-	++	+
GASTRIC	Țesut Normal	80	-	++	+
	Țesut Tumoral	62 (77,5%) T2N0M0 T3N0M0	-	+	+
		18 (22,5%) T3-4N0-2M0-1	-	12 -	+
				6 +	

Discuții

Un aspect specific structurii moleculare a maspinei îl reprezintă structura de α helix a centrului reactiv (RCL) al acesteia. Datorită acestuia este posibilă schimbarea conformației între închis/deschis, mecanism prin care reglează migrarea celulară și apoptoza, fiind unica serpină implicată în reglarea apoptozei – mecanism molecular incomplet elucidat. Conform aceluiași studii RCL permite legarea maspinei la receptorul membranelor pentru collagen I și fibronectină favorizând astfel adezivitatea celulară (157).

Cercetările *in vitro* au evidențiat rolul supresor al maspinei asupra invazivității tumorale și implicit asupra metastazării cât și implicarea ei în declanșarea apoptozei și în angiogeneza peritumorală (209). Tot *in vitro* s-a constatat că maspina determină modificări în expresia proteinelor asociate citoscheletului actinic care conduc la un fenotip mai puțin invaziv al celulelor tumorale, reducând riscul de metastazare.

În urma acestor rezultate, a existat un entuziasm al cercetătorilor de a propune maspina ca marker al agresivității tumorale și de prognostic care a fost temperat de rezultatele heterogene și contradictorii ale studiilor *in vivo* și clinice. Rezultatele prezentului studiu IHC au evidențiat pentru CCR studiate o serie de aspecte care sunt în acord cu unele studii din literatură dar au arătat și existența în cadrul aceleiași stadializări a unei heterogenități a localizării maspinei.

Având în vedere toate aceste elemente se poate considera că supraexpresia citoplasmatică a maspinei însoțită de imunoreactivitate nucleară reprezintă un element de specificitate moleculară a carcinoamelor

colorectale din stadiile localizate. Totodată datele prezentate mai sus sugerează și o funcție dependentă de localizarea subcelulară pentru maspină în cancerul colorectal care ar putea fi utilă în identificarea tumorilor localizate fără invazie tisulară adiacentă și cu sensibilitate la chimioterapie.

Studiul imunohistochimic al expresiei MMP-1, MMP-2 și MMP-9 în cancerul colorectal comparativ cu cel gastric

Rezultate

Studiul imunohistochimic de față a avut ca scop evidențierea și corelarea expresiei metaloproteinazelor 1,2 și 9, cel mai frecvent indicate de studiile din literatură de până în prezent ca fiind implicate în invazivitate și procesul de metastazare a numeroase tipuri de tumori maligne.

Tabel 6.4.I Expresia MMP-1, MMP-2 și MMP-9 comparativ între localizarea colorectală și cea gastrică și stadiul TNM

LOCALIZARE		NR. CAZURI	EXPRESIA MMPs		
COLORECTAL	Țes. Normal		MMP-1	MMP-2	MMP-9
	Țes. Tumoral				
		92	-	-	+
		71 (77,2%)	66 ++	68 +	67 +
		T2N0M0	5 +	3 ++	4 ++
		T3N0M0	19 +	20 ++	21 ++
		21 (22,8%)	2 ++	1 +	
		T3-4N0-2M0-1			
	Țesut Normal	80	-	-	-
	Țesut Tumoral	62 (77,5%)	59 +	60 ++	60 ++
		T2N0M0	3 ++	2 +++	2 +++
		T3N0M0	15 ++	16 +++	16 +++
		18 (22,5%)	3 +	2 ++	2 ++
		T3-4N0-2M0-1			

Discuții

MMPs reprezintă o familie de enzime proteolitice Zn dependente ce pot degrada orice componentă a matricii extracelulare. Am considerat util studiul imunohistochimic al expresiei acestor MMPs având în vedere că majoritatea studiilor din literatură au cercetat

fie expresia doar a unei MMP (ex. MMP-9, MMP-7) sau a MMP-2 și 9, sau MMP-2,9 și 7 fără a corela cu acestea și expresia MMP-1 în circumstanțele conturării unui fenotip malign iar expresia MMPs nu a fost corelată cu cea a unor molecule cu rol la fel de important în invazia tumorală și organizarea tumorilor secundare cum ar fi ezrina și maspina.

În acest sens, cele câteva studii existente în literatură privind expresia MMP-1, numită și collagenaza interstițială deoarece poate dezintegra collagenul fibrilar interstițial tip I, II, III, VII, X, entactina, α 2macroglobulina, au evidențiat importanța sa pentru prognosticul și implicit progresia CCR (228). Pentru țesutul normal colorectal și gastric lipsa expresiei MMP-1 a fost similară cu majoritatea rezultatelor studiilor din literatură, iar pentru 71,2% din tumorile colorectale studiate am evidențiat o expresie moderat pozitivă în timp ce pentru 22,8% o imunoreactivitate slab pozitivă (Tabel 6.4.I) Se poate considera că rezultatele sunt în acord cu cele ale unor studii din literatură evidențiind faptul că în țesuturile normale MMP-1 se găsește în forma sa de proenzimă, deci inactivă. În ceea ce privește țesuturile tumorale expresia sa a fost diferențiată și indică din punct de vedere clinic cel puțin pentru 71,2% din cazuri un stadiu incipient al dezvoltării tumorale și un fenotip mai puțin agresiv. Pentru restul de 22,8% expresia MMP-1 a sugerat un grad mai slab de diferențiere și implicit un prognostic mai sumbru datorită posibilității crescute de apariție într-un timp scurt a metastazelor la distanță.

În cazul tumorilor gastrice, pentru stadiile T2-3N0M0 s-a constatat o expresie slab pozitivă (+) a

MMP-1 iar pentru 3 dintre cazuri expresia a fost moderat pozitivă (++) în timp ce tumorile colorectale cu același stadiu TNM au prezentat majoritar o expresie moderat pozitivă (++). Pentru 15 dintre tumorile gastrice cu stadiile T3-4N0-2M0-1 expresia a fost moderat pozitivă (++), cu prezența unei expresii slab pozitive (+) în 3 dintre tumorile cu aceeași stadializare. Aceste rezultate indică creșterea expresiei MMP-1 în cazul stadiilor avansate și existența unei heterogenități a expresiei acestei MMP în cadrul aceluiași stadiu TNM – aspect similar întâlnit în cazul carcinoamelor colorectale. Conform datelor din literatură creșterea expresiei MMP-1 indică un grad mai slab de diferențiere și un fenotip al celulelor tumorale mult mai agresiv comparativ cu cele cu expresie slab pozitivă.

Supraexpresia MMP-2 și MMP-9 în cazul tumorilor avute în vedere în acest studiu, indică degradarea collagenului de tip IV de la nivelul membranei bazale și implicit dezorganizarea acestei structuri, aspect confirmat și de studiul ultrastructural efectuat pentru aceste tumori. Aceste rezultate sunt în acord și cu ipoteza lansată de Chu și colab. care consideră că nivelul MMP-9 evidențiat prin IHC se corelează pozitiv cu invazivitatea, metastazele limfatice și la distanță, sugerează un prognostic sumbru și că acest tip de MMP ar putea fi un nou marker de prognostic în completarea sistemului de stadializare TNM. Alături de aceasta, nivelele serice ale MMP-2 și MMP-9 sunt considerate de unii autori drept markeri cu sensibilitate mai mare de diagnostic decât cei utilizați în practica curentă (CEA, CA19-9) (236).

Concluzii

- Studiul electronomicroscopic comparat al probelor recoltate de la nivelul tumorilor colorectale și respectiv gastrice furnizează o serie de aspecte morfologice suplimentare ce nu au putut fi observate în microscopia fonică clasică, dar și elemente noi, cu importanță pentru stabilirea diagnosticului și stadiului acestor tumori, cât și pentru managementul lor terapeutic.
- Aspectele ultrastructurale ale diferitelor componente celulare observate în prezentul studiu și evidențierea unei corelații între acestea, rezultatele studiilor moleculare efectuate și prognosticul tumorilor, vin în sprijinul ipotezelor existente în literatură prin care se sugerează existența unei legături între aspectele ultrastructurale și fenomenele secundare ale procesului de tumorigeneză.
- Corelarea datelor din literatură cu rezultatele studiului imunohistochimic indică faptul că nivelul expresiei ezrinei poate fi un marker predictiv pentru răspunsul la terapia cu 5-FU dar și pentru rezistența la unele chimioterapice, în cazul CCR.
- Având în vedere rolurile ezrinei la nivel celular, aspectele identificate pot fi considerate o reflectare în plan molecular a modificărilor morfologice evidențiate prin studiul ultrastructural.
- Prezența la nivel nuclear a imunoreactivității pozitive pentru maspină în cazurile de tumori colorectale avute în vedere corelată cu ipotezele studiilor din literatură indică un stadiu incipient al progresiei tumorale și sensibilitate la chimioterapie.
- În tumorile colorectale – stadiile III și IV, supraexpresia citoplasmatică și nucleară a maspinei se corelează cu un fenotip invaziv crescut al celulelor tumorale fiind un

biomarker al agresivității și riscului crescut de metastazare ganglionară comparativ cu tumorile gastrice, unde subexpresia sau chiar lipsa expresiei maspinei este considerată potențial biomarker de agresivitate.

- Având în vedere localizarea ambelor molecule atât la nivel membranar, citoplasmatic și nuclear în cazul celulelor tumorale colorectale, existența unei corelații inverse între expresia lor conform studiului IHC, implicarea lor în activarea și derularea acelorași căi de semnalizare cu rol în oncogeneza colorectală cât și în realizarea conexiunilor dintre citoschelet și membrană și menținerea integrității zonelor de cuplaj celular, sugerez posibila existență a unui parteneriat molecular între ezrină și maspină în progresia tumorilor colorectale.

- Rezultatele prezentului studiu IHC privind expresia MMP-1 în carcinoamele colorectale și cele gastrice au evidențiat un element de specificitate moleculară al carcinoamelor colorectale – scăderea expresiei MMP-1 în stadiile avansate, deci existența unei corelații negative între stadiul TNM și expresia acesteia.

- Nivelul expresiei MMP-1 poate fi considerat un marker predictiv pentru identificarea în cadrul aceluiași stadiu TNM, a pacienților cu risc crescut de invazivitate tumorală și de dezvoltare a recurenței și implicit necesitatea unei chimioterapii mai agresive.

- Studiul IHC comparativ al ezrinei, maspinei, MMP-1, MMP-2 și MMP-9 în cazul tumorilor colorectale și respectiv gastrice evidențiază un fenotip molecular specific CCR și indică posibilitatea existenței unei interdependențe funcționale între aceste molecule.

Bibliografie selectivă

1. Haggar AF, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, Mortality, Survival and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22: 191-197.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
8. Dakubo GD. *Cancer biomarkers in body fluids*. Springer International Publishing AG, 2017; 179- 212.
158. Said AH, Raufman J-P, Xie G. The role of Matrix Metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers* 2014; 6: 366-375.
162. Czarnecka A, Czarnecki J, Kukwa W, et al. Molecular oncology focus - Is carcinogenesis a 'mitochondriopathy'? *J Biomed Sci* 2010; 17: 31–38.
171. Mitmaker B, Begin L.R, Hordon P.H. Nuclear shape as a prognostic discriminant in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991; 34:249-59.
135. Patara M, Monteiro Santos EM, de Almeida Coudry R et al. Ezrin expression as a prognostic marker in colorectal adenocarcinoma. *Pathol Oncol. Res.* 2011; 17: 827-833.
157. Berardi R, Morgese F, Onofri A, et al. Role of maspin in cancer. *Clinical and Translational Medicine* 2013, 2:8.
209. Lockett J, Yin S, Li X et al. Tumor suppressive maspin and epithelial homeostasis. *J Cell Biochem* 2006; 97: 651-660.
228. Meteoglu I, Erdogdu IH, Tuncyurek P et al. Nuclear Factor Kappa B, Matrix Metalloproteinase-1, p53, and Ki-67 Expressions in the Primary Tumors and the Lymph Node Metastases of Colorectal Cancer Cases. *Gastroenterol Res Pract* 2015; 2015:945392