

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ

IONUȚ ANDREI PĂUNESCU



TEZĂ DE DOCTORAT

VALOAREA DIAGNOSTICĂ A UNOR NOI MARKERI
GENETICI ȘI EPIGENETICI ÎN ADENOMOCARCINOMUL DE
PROSTATĂ

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. CĂTĂLIN MARIAN

Timișoara
2019

Cancerul de prostata este cunoscut ca fiind cea mai frecventa afectiune neoplazica a barbatului si a doua cauza de deces prin cancer, estimandu-se 1,7 milioane de noi cazuri diagnosticate anual pana in 2030, in prezent numarul de cazuri diagnosticate anual fiind de 899000. Incidenta cea mai mare a cancerului de prostate o intalnim in randul afro-americanilor si a jamaicanilor de origine Africana. La nivel mondial reprezintă a șasea cauză de deces prin cancer, estimându-se 258000 de decese anual, ajungându-se la 499000 de decese până in 2030. In SUA, 10% din totalul deceselor prin cancer sunt reprezentate de cancerul de prostata.

Rata mortalității în rândurile afro-americanilor se păstrează de 2,4 ori mai mare față de caucazieni, deși a cunoscut o continuă scădere începând cu 1990. Între 1973 și 2008, rata mortalității la cei diagnosticați cu Cp era de 35%. Diagnosticul precoce, screeningul PSA, terapia curativă au dus la scăderea considerabilă a mortalității. Introducerea screeningului prin PSA a avut un efect major asupra incidenței și mortalității prin cancerul de prostată la nivel mondial. În Statele Unite, riscul de a face Cp s-a dublat de la 7,8% la 15,3% în timp ce mortalitatea a scăzut de la 3% la 2,6%. În 2012, după publicarea rezultatelor studiilor PLCO și ERSPC, Serviciul Forțelor de Prevenție ale US (USPSTF) nu recomandă folosirea de rutină a screeningului prin PSA, în rândurile bărbaților sănătoși, indiferent de vârstă, rasă sau istoric familial, astfel screeningul prin PSA primește grad de recomandare D, adică există îndoieli majore asupra beneficiului net sau efectele secundare depășesc beneficiile.

Având în vedere caracterul plurifactorial al patologiilor neoplazice în general, o parte din eforturile de cercetare a factorilor de risc a cuprins și moștenirea genetică în cancerul de prostata. Prima referire asupra componentei familiale a cancerului de prostată a fost făcută la jumătatea secolului al XX-lea și aducea în discuție riscul crescut de Cp la bărbații cu rude de gradul I care au suferit boala. Studii ulterioare au demonstrat teoria, iar studii pe gemeni au concluzionat faptul că riscul de a dezvolta Cp, în care să fie încrimată moștenirea familială, este cu 40% mai mare decât în cazul oricărui alt tip de cancer. Riscul relativ, crește cu gradul de rudenie, numărul de membrii afectați și vârsta la care au fost diagnosticați. Aproximativ 15% din cancerele de prostată sunt considerate a fi moștenite genetic.

Adenocarcinomul de prostata este o patologie neoplazica hormono dependenta, mai precis, depinde de interactiunea intre testosteron si tesutul prostic. Principalul hormon androgen, cu efecte trofice la nivelul prostatei, este dihidrotestosteronul (DHT), forma activată a testosteronului (T), transformarea fiind catalizată de 5 α -reductază. DHT interacționează cu receptori pentru androgeni (AR) intracitoplasmatici, cu o afinitate mult superioară T, iar în urma acestei interacțiuni, este amplificat procesul de translație al complexului steroid-

receptor la nivel nuclear, cu activarea elementelor de răspuns androgenic (AREs). 5 α -reductaza tip 1 este exprimată preponderent la nivelul pielii și a ficatului, mai puțin la nivel prostatic, pe când enzima de tip 2 se distribuie exclusiv la nivelul prostatei și a altor țesuturi genitale. Fenotipurile cu deficit moștenit de 5 α -reductază prezintă țesut prostatic minimal, predominant stromal, studiile histopatologice demonstrând absența componentei epiteliale. Deficitul de T, substratul hormonal al enzimei, pare să asigure efect protector, cu argumentul atrofiei prostatice consecvente castrării chirurgicale. Totuși, există cazuri documentate de ADC-P la adulți hipogonadali, iar aceste cancere acuză, etiopatogenic, alte mecanisme de proliferare tumorală, intuitiv independente de activitatea androgenilor.

În prezent diagnosticul cancerului de prostata, se realizează de rutină prin corelarea valorii PSA cu rezultatul tuseului rectal. Cel mai adesea, diagnosticul este obținut prin PBP sub ghidaj ecografic transrectal, înainte de apariția tabloului clinic, iar conduita post-diagnostic are ca scop central stadializarea patologiei, prin evaluarea extensiei tumorale, și încadrarea într-o grupă de risc, în vederea stabilirii prognosticului și a strategiei de management. Pe lângă PSA și TR, trăsăturile histopatologice (SG și volumul tumoral) și studiile imagistice (evaluarea extensiei loco-regionale și a prezenței metastazelor) vor facilita luarea de decizii informate referitoare la management.

Din păcate evaluare prin PSA și tuseu rectal nu poate diagnostica adenocarcinomul de prostata în stadii incipiente, unul dintre motive fiind faptul că analiza PSA nu este specifică pentru cancerul de prostata, valoarea antigenului prostatic specific putând fi influențată de injurii prostatice non neoplazice. Per ansamblu, prezența unei patologii prostatice (Cp, hiperplazia prostatică benignă – HPB sau prostatită) este principalul factor care influențează expresia serică a PSA-ului, fiind postulată teoria conform căreia creșterile PSA-ului seric apar în contextul alterării arhitecturii glandulare, care facilitează eliberarea acestuia în circulație. Deși un nivel crescut al PSA-ului poate indica prezența unei patologii prostatice, nu toți bărbații cu patologie prostatică reclamă niveluri serice crescute ale PSA-ului, iar creșterea PSA-ului nu este specifică pentru Cp, fiind observată și în contextul manipulării prostatice (TR, PBP, rezecție transuretrală – TUR-P)

Au fost propuși o serie de biomarkeri, serici, urinari și genetici. Biomarkeri serici consacrați sunt reprezentați de PSA și derivatele PSA, PSMA (antigenul membranal specific prostatic) Kalicreina umană 2 (hK2), biomarker similar PSA-ului.

Primul biomarker urinar al adenocarcinomului de prostata a fost PCA3 inițial descris de Bussemakers și colab. (1999). Deși funcția PCA3 rămâne necunoscută, multiple studii au demonstrat că PCA3 este o specie de lncARN, care nu prezintă expresie extraprostatică, gradul de

expresie al PCA3 fiind, în general, mult crescut în țesutul malign prostatic, față de cel benign. Spre deosebire de PSA, valorile expresiei PCA3 sunt independente de volumul prostatic.

Conceptul unui biomarker unic al cancerului de prostată, capabil să răspundă tuturor întrebărilor clinice importante, aferente patologiei, devine tot mai neverosimil, motiv pentru care multiple inițiative de elaborare a unor sisteme integrative de biomarkeri ai Cp au fost lansate, acestea reprezentând valoare adăugată procesului diagnostic.

Grație revelației conform căreia mare parte din ADN-ul genomic nu codează aranjamente proteice, utilitatea acestor secvențe în modularea expresiei genice a devenit un subiect de mare actualitate în literatură. Posibil cele mai importante componente ale acestui tip de modulare genică sunt speciile de microARN (miARN), secvențe scurte de ARN monocatenar non-codant (19-22 de nucleotide), implicate în modularea ARN-ului mesager (mARN). Acestea au fost detectate într-o varietate largă de lichide biologice și sunt investigate ca potențiali biomarkeri pentru o varietate de malignități. Având în vedere potențialul rol etiopatogenic al speciilor miARN, acestea ar putea oferi informații diagnostice și prognostice esențiale.

La nivelul celulei tumorale, speciile de miARN acționează prin două mecanisme distincte: supraexpresia speciilor miARN care promovează carcinogeneza, prin inhibiția expresiei unor gene de supresie tumorală, numite secvențe miARN oncogenice (OncomiARN), sau expresia deficitară a speciilor miARN care, în mod normal, suprimă transformarea neoplazică, prin inhibiția expresiei unor proto-oncogene, numite secvențe miARN de supresie tumorală.

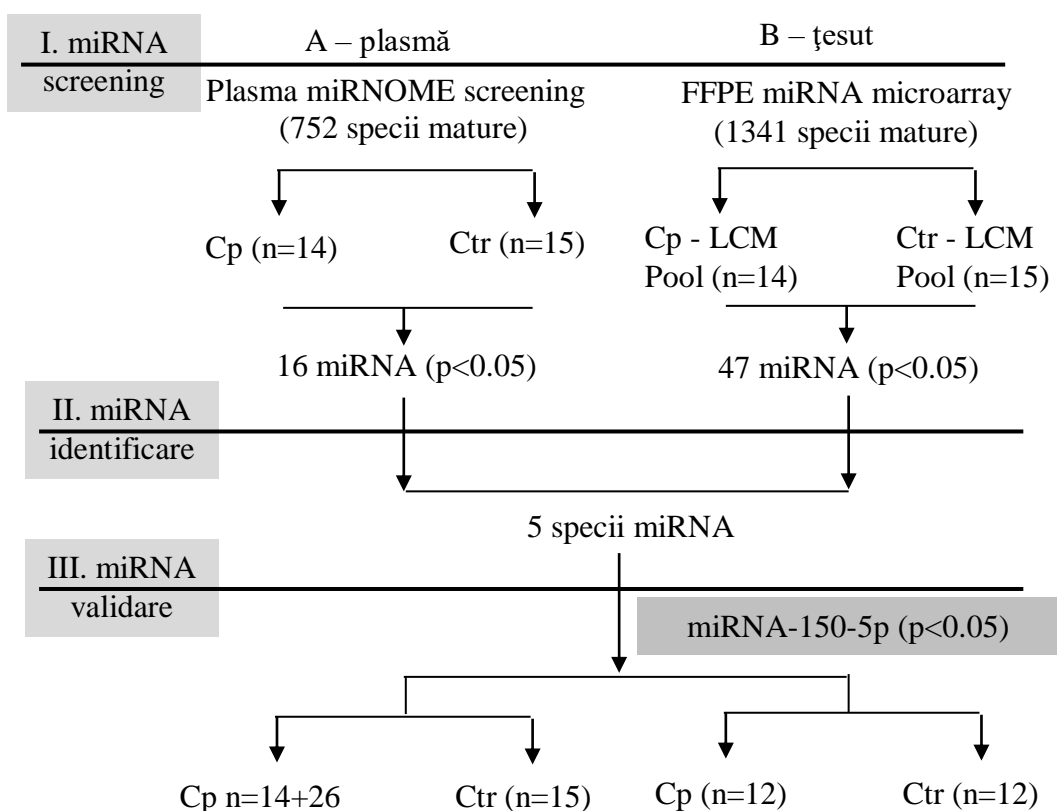
Teza de doctorat „Valoarea diagnostică a unor noi markeri genetici și epigenetici în adenomocarcinomul de prostată” are ca și obiectiv principal identificarea speciilor miRNA circulante, specifice cancerului de prostată, care pot discrimina cu precizie pacienții cu cancer de subiecții sănătoși, respectiv pot servi ca și biomarkeri pentru screening, diagnostic și managementul clinic al cancerului de prostată. Al doilea obiectiv constă în validarea panelului de miRNA circulant ca biomarker, într-un studiu de tip caz-control de cancer de prostata și de a investiga asocierea speciilor miRNA cu caracteristici clinice și patologice. Al treilea obiectiv este reprezentat de validarea miRNA circulant în țesut prostatic parafinat (FFPE). Al patrulea obiectiv a constat într-o analiză de metilare și hidroximetilare a ADN periferic ca biomarker în cancerul de prostată.

Recrutarea subiecților incluși în prezentul studiu a fost avizată de Comisia de Etică a Cercetării Științifice din cadrul Universității de Medicină și Farmacie ”Victor Babeș” din Timișoara (Aviz CECS Nr 09/13.05.2014), precum și de Comisia de Etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara (Aviz 71/05.08.2014).

Pentru realizarea studiului s-au constituit două loturi de subiecți: **lotul de pacienți** – bărbați cu adenocarcinom de prostată confirmat histopatologic și scorul Gleason mai mare ca 5, cu vârsta peste 50 de ani și care nu au suferit de alta patologie neoplazică în antecedente și **lotul de control** – bărbați fără patologie prostatică cu valoare PSA mai mică de 4 ng/ml confirmată prin *chemiluminescent microparticle immunoassay* (Abbott Diagnostics), cu vârsta peste 50 de ani și fără simptomatologie asociată tractului urinar inferior. Toți subiecții incluși în acest studiu au semnat fișa de consimțământ informat. Datele subiecților au fost centralizate din foile de observație, urmărindu-se următoarele aspecte: vârsta, valoarea PSA, scorul Gleason și rezultatul anatomopatologic al piesei de biopsie acolo unde era cazul.

Analiza profilului miRNA în plasma și țesutul pacienților cu cancer de prostată (Cp) a identificat 5 specii miRNA a căror expresie este modificată față de controlii fără patologie prostatică (Ctr): miRNA-130a-3p, miRNA-145-5p, miRNA-148a-3p, miRNA-150-5p, miRNA-365a-3p. Dintre aceștia numai 3 specii au prezentat modificări concordante în țesut și plasmă: miRNA130a-3p și miRNA-150-5p au fost subexprimate și miRNA-148a-3p a fost supraexprimată. Dintre aceștia numai miRNA-150-5p a fost validat ca fiind semnificativ statistic subexprimat în plasmă și probe FFPE tumorale cu o modificare de expresie de -2.697 ($p < 0.001$) respectiv -1.693 ($p = 0.035$). Analiza ROC a evidențiat o valoare AUC de 0,817 (95%CI: 0.680-0.995) pentru plasmă și 0.809 (0.616-1.001) pentru țesut. Datele obținute de noi sugerează că variația expresiei miRNA-150 în plasmă este concordantă cu cea din țesutul tumoral.

O prezentare schematică a designului care a condus la identificarea miRNA150 ca potențial biomarker în cancerul de prostată este prezentată mai jos.



Alegerea miRNA-150-5p pentru validarea individuală a fost motivată de numărul mic de date din literatura de specialitate. În urma analizei datelor obținute în urma analizei individuale a rezultat că miRNA-150-5p este semnificativ subexprimat în plasmă și FFPE provenite de la pacienți Cp cu o modificare de expresie de -2.697 ($p < 0.001$) în plasmă și -1.693 ($p = 0.035$) în FFPE.

Pentru a confirma datele de literatura în ceea ce privește expresia miRNA-150-5p în linii celulare de cancer de prostată, am investigat acest lucru în celule LnCAP (celule canceroase de prostată) comparativ cu celule epiteliale prostatice normale (PPEC - Primary prostate epithelial cells). Expresia relativă a miRNA-150-5p în LnCAP comparativ cu PPEC, confirma expresia semnificativ mai scăzută ($p < 0.005$) a acestui microRNA în celulele canceroase descrise în literatura, precum și observațiile noastre din țesut și periferie.

În ceea ce privește nivelul de metilare și hidroximetilare, acesta este primul studiu în care se măsoară atât nivelul global de metilare ADN, cât și nivelul de hidroximetilare în celulele sanguine nucleate periferice în cazul pacienților cu cancer de prostată comparativ cu grupul control. Cu toate că acesta este un studiu pilot cu un număr limitat de probe, am confirmat datele prezentate în singurul studiu disponibil care arată că nivelul de hidroximetilare a ADN în celulele sanguine nu este diferit la pacienții cu cancer de prostată comparativ cu grupul control. Studiul menționat a folosit aceeași metodă de analiză a nivelului de hidroximetilare în celulele sanguine, obținând valori similare pentru grupurile de cancer de prostată și control. Cu toate acestea, subiecții cu hiperplazie prostatică benignă (BPH) și proliferare atipică cu structuri mici acinare (ASAP) (atypical small acinar proliferation) au prezentat niveluri semnificativ mai mari de hidroximetilare comparativ cu grupul control. Din păcate, nu am inclus subiecți cu BPH și ASAP în acest studiu. Comparativ cu țesutul prostatic normal, țesutul canceros prezintă niveluri mai scăzute de 5hmC, care este reglat cel puțin parțial de enzime din clasa *ten-eleven translocation (TET) proteins*, care oxidează 5-metil citozina la 5-hidroximetil citozină și apoi la alți derivați. Se pare că acest tipar este localizat în țesutul prostatic și nu este reflectat de celulele sanguine nucleate periferice ale pacienților cu cancer de prostată.

Din cei peste 700 de microRNA analizați în plasma și exozomii din plasma pacienților cu cancer de prostată, s-au identificat 127 de miRNA exprimați diferențial între exozomi și plasmă la pacienții cu cancer de prostată. Se observă o separare clară a celor 2 grupuri

(plasma și exozomi) pe baza expresiei diferite a speciilor de miRNA, sugerând existența unor specii de miRNA specifice pentru cele două fracțiuni sanguine.

Analiza bioinformatică a relevat că principalul proces patologic cărui aparțin aceste specii de miRNA este reprezentat de cancer, iar principalele procese celulare și moleculare implicate sunt legate de dezvoltarea, proliferarea, motilitatea, ciclul celular și supraviețuirea celulelor, toate acestea fiind procese reprezentative pentru procesul carcinogenetic.

În ce privește analiza comparativă a expresiei miRNA în plasma totală între pacienți și subiecți control, s-au detectat în total în probele de plasma un număr de 262 de miRNA, din care 147 au fost detectați atât în plasma de la pacienți, cât și la control, 113 miRNA au fost detectați doar la control, iar 2 specii de miRNA doar la cazuri. Dintre cei 147 de miRNA comuni, 70 sunt diferențial exprimați între cazuri și control, la un prag de semnificație de $p < 0.05$ ajustat pentru comparații multiple. Și în acest caz analiza bioinformatică a relevat faptul că principalul proces patologic cărui aparțin aceste specii de miRNA este reprezentat de cancer. De asemenea, singura rețea de semnalizare identificată include cancerul, sugerând o implicare clară în această patologie a acestor miRNA.

În urma aplicării unor criterii stringente de analiză statistică și normalizare a datelor, s-au reținut în final un panel format din 16 miRNAs cu expresia plasmatică relativ semnificativ diferită între cazuri și control, toți având potențial de biomarker relativ ridicat, exprimat printr-o arie AUC de peste 0.70. Mai mult decât atât, potențialul de biomarker a fost întărit și de faptul că unii dintre aceștia au revenit la un nivel de expresie similar cu controlii în cazul pacienților cu prostatectomie radicală.

În mod similar miRNAs din plasma totală, în cazul celor prezenți în exozomi, s-au reținut în final un panel format din 7 miRNAs cu expresia plasmatică relativ semnificativ diferită între cazuri și control, majoritatea (>70%) având potențial de biomarker relativ ridicat, exprimat printr-o arie AUC de peste 0.70. Mai mult decât atât, potențialul de biomarker a fost întărit și de faptul că unii dintre aceștia au revenit la un nivel de expresie similar cu controlii în cazul pacienților cu prostatectomie radicală.

S-a efectuat analiza comprehensivă a întregului miRnom în probe de țesut prostatic arhivate în blocuri de parafină vechi de mai bine de 10 ani, remarcabil fiind faptul că s-a reușit acest lucru în probe prelucrate prin microdisecție cu laser, acesta fiind unul din puținele studii de acest gen publicate până în prezent în cazul cancerului prostatic.

Analiza profilului miRNA în plasma și țesutul pacienților cu cancer de prostată (Cp) a identificat 5 specii miRNA a căror expresie este modificată față de controlii fără patologie prostatică (Ctr): miRNA-130a-3p, miRNA-145-5p, miRNA-148a-3p, miRNA-150-5p, miRNA-365a-3p. Dintre aceștia numai 3 specii au prezentat modificări concordante în țesut și

plasmă: miRNA130a-3p și miRNA-150-5p au fost subexprimate și miRNA-148a-3p a fost supraexprimată. Dintre aceștia numai miRNA-150-5p a fost validat ca fiind semnificativ statistic subexprimat în plasmă și probe FFPE tumorale cu o modificare de expresie de -2.697 ($p < 0.001$) respectiv -1.693 ($p = 0.035$). Analiza ROC a evidențiat o valoare AUC de 0,817 (95%CI: 0.680-0.995) pentru plasmă și 0.809 (0.616-1.001) pentru țesut. Datele obținute de noi sugerează că variația expresiei miRNA-150 în plasmă este concordantă cu cea din țesutul tumoral. Mai mult decât atât, am confirmat tendința de subexpresie a acestui microRNA și în cazul liniilor celulare prostatice comparativ cu linii celulare normale de epiteliu prostatic, confirmând astfel și datele din literatura.

Analiza literaturii științifice de specialitate a relevat că acest studiu este unic prin investigarea nivelului circulant al miRNA-150 la pacienții cu Cp. În plus prin microdisecție laser a țesutului prostatic tumoral FFPE s-au redus considerabil erorile induse prin prezența celulelor non-tumorale printre celulele canceroase reducând sursele de erori la măsurarea expresiei miRNA în țesut tumoral.

În ce privește analiza metilării și hidroximetilării, s-a observat că nivelul mediu de metilare globală a ADN a fost de 1,15% în cazul pacienților cu cancer și 2,29% în cazul controlilor. Diferența de metilare de aproape 2 ori a fost semnificativă statistic ($p < 0,0001$), pacienții cu cancer de prostată prezentând o hipometilare pronunțată comparativ cu grupul control. Nivelul mediu de hidroximetilare globală a ADN a fost similar la pacienții cu cancer de prostată și la grupul control (0,022%, respectiv 0,028%), fără a prezenta semnificație statistică. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu în care se măsoară atât nivelul global de metilare ADN, cât și nivelul de hidroximetilare în celulele sanguine nucleate periferice în cazul pacienților cu cancer de prostată comparativ cu grupul control