

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TEZĂ DE DOCTORAT

Utilizarea biomarkerilor în monitorizarea post-terapeutică a pacienților oncologici cu cancer colorectal

Doctorand: **Mihai-Ștefan Mureșan, MD**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Alexandru Irimie, MD, Ph.D**



CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Noțiuni generale despre cancerul colorectal	19
1.1. Anatomia și patologia oncologică a colonului și rectului	19
1.1.1. Anatomia macroscopică a colonului și rectului	19
1.1.2. Patologia cancerului colorectal	21
1.2. Epidemiologia cancerului colorectal	22
1.2.1. Factorii de risc și etiologici pentru cancerul colorectal	23
1.2.2. Stadializarea cancerului colorectal	27
1.3. Istoricul natural al cancerului colorectal	27
2. Managementul multidisciplinar al cancerului colorectal	29
2.1. Screeningul cancerului colorectal	29
2.1.1. Screeningul cancerului colorectal al pacienților cu risc scăzut	30
2.1.2. Screeningul cancerului colorectal al pacienților cu risc crescut	31
2.2. Managementul cancerului colorectal	31
2.2.1. Managementul cancerului de colon	32
2.2.1.1. Managementul cancerului de colon localizat	32
2.2.1.2. Managementul cancerului de colon local avansat și a cancerului de colon recidivat locoregional (Stadiul III-IV)	34
2.2.1.3. Managementul cancerului de colon în stadiu metastatic	35
2.2.2. Managementul cancerului rectal	36
2.2.2.1. Managementul cancerului de rect localizat	36
2.2.2.2. Managementul cancerului de rect local avansat și a cancerului de rect recidivat locoregional	39
2.2.2.3. Managementul cancerului rectal metastatic (Stadiul IV)	40
3. Rolul biomarkerilor în diagnosticul și urmărirea post-terapeutică a pacienților oncologici	41
3.1. Biomarkerii în oncologie	41
3.2. MicroARN-urile și utilizarea acestora în practica clinică	42
3.2.1. MicroARN-urile și microclimatul tumoral	44
3.2.2. Profilele expresiei MicroARN-urilor în metastazele hepatice din cancerul colorectal	45
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteză de lucru și obiective	55
2. Metodologia generală	57
3. Studiul 1 – Rezultate post-terapeutice al managementului multidisciplinar al pacienților cu cancer colorectal într-un centru terțiar de cancer din România	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteză de lucru și obiective	60
3.3. Pacienți și metode	60
3.4. Rezultate	62
3.5. Discuții	83
3.6. Concluzii	86
4. Studiul 2 – MicroARN-ul 375 transportat la nivelul exozomilor inhibă proliferarea și diseminarea celulară tumorală via proteina Bcl-2 în cancerul de colon	87
4.1. Introducere	87

4.2. Ipoteză de lucru și obiective	88
4.3. Material și metodă	89
4.4. Rezultate	91
4.5. Discuții	100
4.6. Concluzii	101
5. Studiul 3 – Influența MicroARN-ului 194 și MicroARN-ului 1228 asupra proliferării tumorale în cancerul de colon și a metastazelor via phospho S6	103
5.1. Introducere	103
5.2. Ipoteză de lucru și obiective	103
5.3. Pacienți și metode	104
5.4. Rezultate	106
5.5. Discuții	113
5.6. Concluzii	115
6. Concluzii generale	117
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123
ANEXE	143
ANEXA 1 – clasificarea și stadializarea TNM (American Joint Committee on Cancer – AJCC) pentru cancerul colorectal (Ediția a 8-a)	

Cuvinte cheie : cancerul colorectal, nișa metastatică, biomarkeri, exozomi, microARN/miARN/miR, oncogene, supresie tumorală, tratament multidisciplinar, progresia tumorală, invazia tumorală

INTRODUCERE

Cancerul colorectal este o problemă de sănătate publică la nivel mondial, fiind al treilea cel mai comun cancer în rândul pacienților de sex masculin și al doilea în rândul pacientelor de sex feminin. În anul 2016, aproximativ 600,000 de decese au fost raportate ca fiind în relație cauzală cu cancerul colorectal din totalul deceselor de cauză oncologică, cu mai mult de 100,000 de cazuri noi diagnosticate numai în Statele Unite. În România, acest tip de malignitate este al doilea cel mai frecvent cancer în rândul pacienților de sex masculin și al treilea în rândul pacientelor de sex feminin, cu aproximativ 11,000 de cazuri noi preconizate pentru anul 2016. Având în vedere faptul că doar 40% dintre pacienții cu cancer colorectal sunt diagnosticați în stadiile incipiente de boală localizată, cu o rată de supraviețuire de 90% la 5 ani, și aproximativ 21% din restul pacienților sunt diagnosticați în stadiul de boală avansată sau în stadiile metastatice ale bolii, cu o rată de supraviețuire de doar 10% la 5 ani, este imperios necesară facilitarea diagnosticării incipiente care să ofere un tratament eficient și adaptat neoplaziilor asimptomatice. Pentru facilitarea unei terapii individualizate, precum și pentru dezvoltarea viitoarelor metode de tratament, este imperativ necesar să înțelegem mecanismul molecular care controlează creșterea tumorală și metastazarea.

Având în vedere că, cancerul colorectal devine simptomatic doar în stadiile de boală avansate, iar screening-ul utilizând colonoscopia nu este sistematic utilizat pe plan mondial, este necesară introducerea și implementarea unor testări serologice folosite în stadiile incipiente, care ar putea să fie ieftine, repetabile, investigator-independente, cu scopul utilizării ca metodă de screening. Actualmente, singurul marker serologic folosit în urmărirea post-terapeutică a cancerului colorectal este antigenul carcinoembrionar (ACE), cu o specificitate și sensibilitate modestă pentru diagnosticul incipient al neoplaziei, dar cu o bună predictibilitate referitoare la recidiva tumorală.

Tendențele actuale ale oncologiei moderne sunt bazate pe analiza moleculară, prin promovarea dezvoltării noilor metode de diagnostic și terapie utilizând informații din medicina translațională care pot facilita o terapie individualizată, ce până în momentul de față au fost inaccesibile.

Noi strategii au fost investigate pentru a găsi molecule reprezentative (biomarkeri), cu scopul de a oferi o predicție în răspunsul tumoral spontan sau la tratament. Astfel, multiple specii de microARN-uri au fost descrise ca putând fi regulatori cheie a diferitelor procese biologice, prin modularea expresiei genice. Diferite tipuri de neoplazii conțin tipuri specifice de microARN-uri cu roluri potențial diferite, dar valoarea prognostică a utilizării microARN-urilor în predicția răspunsului tumorilor metastatice este insuficient cunoscută și investigată. Prin înțelegerea mecanismelor moleculare și genetice prin care carcinomul *in situ* este capabil să invadeze membrana bazală, să crească în dimensiuni și să disemineze în organe la distanță, prin evitarea sistemului imunitar al gazdei și dobândirea rezistenței la chimioterapia sistemică, putem dezvolta tratamente valoroase și aplicabile în cancerologie. Evenimentele epigenetice care sunt corelate cu un feedback pozitiv între celulele tumorale și țesutul fibros din jurul acestora ar putea fi cheia răspunsurilor multor întrebări privind detectarea incipientă și implementarea unui management îmbunătățit privind cancerul colorectal.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteză de lucru și obiective

Ipoteza primară a acestui studiu este referitoare la faptul că tumora primară eliberează microARN-urile utilizând transportul prin exozomi către sângele periferic, facilitând nișa metastatică.

Scopul 1. Evaluarea implicării tratamentului multidisciplinar al cancerului colorectal într-un centru terțiar de cancer din România.

Tratamentul multidisciplinar al cancerului colorectal oferă rezultate similare post-terapeutice dintr-un centru terțiar de cancer din România comparativ cu rezultatele raportate pe plan internațional.

Scopul 2. De a studia rolul microARN-urilor în cadrul tumorii primare precum și în cadrul eliberării exozomilor la pacienții cu cancer colorectal cu și fără metastaze hepatice, cu scopul de a prezice dacă un microARN specific este responsabil pentru dezvoltarea nișei metastazării hepatice (oncogene) sau invers, dacă poate inhiba creșterea tumorală, promovând apoptoza și prevenind diseminarea celulelor tumorale (supresor tumoral).

Acest **scop specific** al tezei se concentrează pe descoperirea de noi biomarkeri folosiți în urmărirea post-terapeutică a pacienților cu cancer colorectal, după tratament chirurgical cu viză curativă sau pacienți aflați în remisie completă după terapia multimodală, care ar putea fi implementați în a prezice recidiva locală sau posibila dezvoltare a nișei metastatice. Biomarkerii aleși pentru a fi studiați sunt specii de microARN sau molecule precum exozomii care nu sunt încă incluși în ghidurile oficiale de urmărire post-terapeutică a cancerului colorectal. Ghidurile actuale nu recomandă utilizarea a niciunui fel de marker molecular, exceptând antigenul carcinoembrionar (ACE). Dezvoltarea acestui domeniu este încă într-un stadiu incipient și, din acest punct de vedere, studiul nostru concurează cu un număr crescut de alte studii cu scopul de a descoperi și implementa în practica clinică a noi metode de urmărire a pacienților cu cancer colorectal după terapia inițială, cu scopul de a detecta recidivele cât mai precoce posibil. Având acces la o platformă de microarray-uri ne permite să căutăm noi biomarkeri pe lângă cei care deja au fost descriși în literatură.

Metodologie generală

Nu a fost folosită o metodologie generală specifică pentru elaborarea și editarea tezei.

Fiecare studiu individual a avut metodologia specifică acestuia, descrisă în cadrul capitolului "Materiale/Pacienți și Metode". O atenție deosebită a fost atribuită studiilor 2 și 3, în care metodologia a constat în izolarea și descrierea exozomilor, a speciilor de microARN și a culturilor celulare.

După obținerea acordului scris al pacienților pentru a lua parte din aceste studii, mostre din plasma/serul lor, din țesutul sănătos și cel tumoral au fost păstrate la minus 280°C într-un recipient special în oxid nitric. Toți pacienții înscriși în studiu au avut parte de tratament primar sau secundar efectuat în cadrul Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" (IOCN), Cluj-Napoca, Romania.

Toate micro-array-urile, culturile celulare, testele de migrare celulară, testele de invazivitate, testele Western-blott și PCR-arrays, au fost efectuate și manageriate în cadrul Centrului de Cercetare pentru Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină Translațională a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, Romania, conform unui contract de colaborare scris între autor și directorul Centrului, Prof. Ioana Berindan-Neagoe, PhD (20/23.04.2015). Toate lichidele biologice, fragmente din speciimenele tumorale și datele pacienților au fost adunate și stocate în cadrul unei bio-bănci în cadrul facilității.

Studiul 1 – Rezultatele post-terapeutice ale managementului multidisciplinar a pacienților cu cancer colorectal dintr-un centru terțiar de cancer din România

Scop. Scopul primar al acestui studiu a fost de a prezenta beneficiile tratamentului multidisciplinar al cancerului colorectal într-un centru terțiar de cancer din România („Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca - IOCN). Scopul secundar al acestui studiu a fost de a compara opțiunile terapeutice utilizate pentru tratamentul pacienților cu această neoplazie ghidurilor internaționale comprehensive utilizate actualmente în managementul oncologic și studiilor de cohort similar, din literatură. Scopul terțiar al acestui studiu a fost de a analiza rezultatele post-terapeutice obținute pe eșantionul de pacienți (intervalul liber de boală, supraviețuirea globală, recidiva generală, etc), și a le asocia cu anumite caracteristici specific neoplaziei. Scopuri adiționale au constat în identificarea limitărilor și neajunsurilor protocoalelor de conduită oncologică locală, în comparație cu rezultatele prezentate în literatură, stabilind astfel viitoare direcții de augmentare a abordării comprehensive multidisciplinare, la nivel local. **Pacienți și metode.** Ulterior aplicării criteriilor de includere și excludere, un total de 99 de pacienți diagnosticați cu cancer colorectal, tratați pentru această patologie în cadrul IOCN, au fost găsiți eligibili pentru a fi incluși în studiu, dintr-un număr total de 331 de pacienți aflați în evidența IOCN în intervalul ianuarie 2014-ianuarie 2015. Datele de statistică descriptive populațională (vârstă, sex, mediu de proveniență, simptomatologie la internare, , antecedente familiale și personale relevante pentru cancer, diagnostic paraclinic, intervenție chirurgicală, tratament neoadjuvant/adjuvant, complicații post-operatorii, mortalitatea intra și extraspitalicească, numărul de luni al urmării postterapeutice, etc)

au fost centralizate utilizând baze de date ale software-ului Microsoft® Excel cu rezultate exprimate prin iconografie de tipul pie, charts și medie \pm SD. Intervalul liber de boală, supraviețuirea globală au fost calculate utilizând testul Mantel Cox logrank și exprimate prin curbe Kaplan-Meier utilizând același software. **Rezultate.** O incidență mai mare a cancerului colorectal a fost observată în rândul pacienților de sex masculin (60%), cu o proveniență mai accentuată din mediul urban (75%), având o vârstă medie la diagnostic de 60.5 ± 11.9 ani (95% CI: 58.1 – 62.9). Perioada medie de urmărire a pacienților a fost de 22.3 ± 10.1 luni (95% CI: 12.1 – 48). Doar 9% dintre pacienți au avut un istoric familial de boală relevant pentru neoplasia colorectală, din care, 8% au fost etichetați drept purtători ai unor patologii premaligne. Cea mai frecventă simptomatologie raportată în momentul internării a fost hemoragia digestivă inferioară (rectoragie/hematochezie) (39% dintre pacienți). 58% dintre cancerurile colorectale diagnosticate au fost localizate la nivelul colonului, 37% la nivelul rectului și 5% la nivelul joncțiunii rectosigmoidiene. Valoarea medie a ACE (ng/dl) determinate la momentul diagnosticului a fost de 14.4 ± 27.8 ng/dl (95% CI: 7.3 – 21.5). 98% dintre pacienți au fost supuși cel puțin unei colonoscopii asociate cu un CT TAP cu s.c i.v. Toate cazurile de cancer rectal au fost evaluate fie printr-un RMN pelvin, fie printr-o eco-endoscopie pentru obținerea unui staging optimal. Foarte puține dintre cazurile de cancer rectal au fost monitorizate în timpul și ulterior efectuării tratamentului neoadjuvant prin RMN cu secvență DWI. Un sfert dintre cazurile de cancer de colon și joncțiune rectosigmoidiană au fost diagnosticate de la debut în stadiu avansat loco-regional, potențial rezecabil, cu restul de 75% dintre pacienți diagnosticați cu boală limitată local. Situația a fost mai favorabilă în cazul cancerelor rectale, unde doar 11% dintre pacienți au prezentat boală avansată la debut cu metastaze sincrone, cu restul de 89% dintre aceștia prezentând fie cancer rectal incipient, fie boala avansată local. Determinarea preterapeutică a statusului mutațional K-RAS/all-RAS din probele biopsice a fost efectuată doar pentru 3% dintre pacienți. Statusul MSI pre-terapeutic nu a fost determinat pentru nici unul dintre pacienți. Stadializarea imagistică TNM a avut o acuratețe de 95% raportată la stadializarea piesei de exereză tumorală. Pentru 83% dintre cancerurile localizate la nivelul colonului și joncțiunii rectosigmoidiene, chirurgia primară a fost tratamentul preferat. Doar pentru 10% dintre pacienți, unde a fost fezabil, rezecția multiorgan, hepatică sau peritoneală concomitentă cu exereza tumorii primare, a fost efectuată. Histologia primară raportată a fost cea de adenocarcinom, în toate cazurile, cu subtipurile sale aferente. 52% dintre tumorile primare au fost scrise ca având un tip de invazivitate (perineurală, intralimfatică, intravenoasă sau mixtă). Indiferent de localizarea tumorii primare, 57% dintre histologiile primare a fost moderat diferențiate. Media numărului de ganglioni rezecați cu specimenul de exereză a fost de 22.5 ± 10.3 limfonoduli (95% CI: 4-63). 10 pacienți (9% din totalul pacienților) cuantificând 27% dintre pacienții diagnosticați cu cancer rectal primar ce au fost supuși terapiei neoadjuvante, au prezentat un răspuns pathologic complet pe piesa de exereză chirurgicală, fără tumoră restantă pe specimen. Mortalitatea intraspitalicească raportată a fost de 1% la 7 zile postoperator, cu o mortalitate de 3% la 30 de zile postoperator. În 72% dintre cazuri nu au fost raportate nici o complicație postoperatorie în scala de clasificare Clavien-Dindo. Peste o pătrime din pacienți (27%), cu tumora primară localizată la nivelul colonului sau a joncțiunii rectosigmoidiene, nu au necesitat tratament adjuvant. 57% dintre cazurile de cancer rectal au primit chimioterapie adjuvantă. 14% dintre pacienții diagnosticați cu cancer rectal incipient, operați primar, nu au necesitat terapie adjuvantă. În schimb, 18% dintre pacienții stadializați preoperator având un cancer rectal incipient, au fost stadializați ulterior rezultatului anatomo-patologic la un stadiu superior, necesitând chimio+/-radioterapie adjuvantă. Ulterior tratamentului multidisciplinar, rata de recidivă globală decelată pentru perioada de urmărire post-terapeutică a fost de 29%, din acest procent, 62% f(18 pacienți), prezentând boală metastatică la distanță. Locația predilectă a recidivei la distanță a fost ficatul (57%), urmat de plămân și peritoneu (25%), metastaze solitare pulmonare (4%). Comparând intervalul liber de boală al cancerelor de joncțiune rectosigmoidiană, fără metastaze, cu aceleași canceruri cu metastaze la diagnostic, primele au o supraviețuire globală mai bună (16 vs. 7 luni) ($p = 0.0278$, Log-rank, Mantel Cox Test), cu un HR de recidivă de 0.26 (95% CI: 0.07-0.86). Același trend poate fi observat în cazul cancerelor rectale non-metastatice vs. cele metastatice la diagnostic (19 vs. 6.5 luni, supraviețuire medie) ($p = 0.0023$, Log-rank, Mantel Cox Test); cu un HR de recidivă de 0.036 în detrimentul bolii metastatice la debut (95% CI: 0.004 - 0.3). În eșantionul de pacienți selecționați, supraviețuirea globală la 4 ani a fost semnificativ mai bună în cazul localizărilor primare colice și rectosigmoidiene, în situația absenței metastazelor primare (17 vs. 7 luni, în cazul prezenței determinărilor secundare) ($p = 0.02$, Log-rank, Mantel Cox Test), cu un HR de episod fatal de 0.29 (95% CI: 0.09 – 0.87) în defavoarea pacienților cu boală metastatică. O situație asemănătoare privind supraviețuirea globală la 4 ani a fost identificată în cazul pacienților cu cancer rectal primar non-metastatic, comparative cu boala metastatică la debut (25 vs 12 luni) ($p = 0.005$, Log-rank, Mantel Cox Test); cu un HR pentru exitus de 0.23 (95% CI: 0.083 – 0.65) în cazul bolii metastatice. Pentru cei 61 de pacienți cu valorile ACE determinate la momentul diagnosticului (ng/dl), nu au fost găsite regresii liniare statistice relevante raportate la supraviețuirea globală la 4 ani. **Discuții și concluzii.** Rezultatele suitei de cazuri prezentate în studiul de față, demonstrează eficiența tratamentului multidisciplinar comprehensiv adaptat fiecărui caz în parte, cu

rezultate bune post-terapeutice, obținute într-un centru terțiar de cancer. Chiar și așa, studiul de față ridică importante deficite naționale, privitoare la diagnosticul, tratamentul și urmărirea pacienților cu cancer colorectal. Este necesară adaptarea tratamentului cancerului colorectal fiecărui pacient în parte, cu scopul de a facilita răspunsul terapeutic optimal și alinarea simptomatologiei.

Studiul 2 - MicroARN-ul 375 este responsabil de progresia celulară și inhibarea diseminării tumorale prin blocarea proteinei Bcl-2 în cancerul colorectal.

Scopuri. Scopul acestui studiu este de a determina dacă MicroARN-ului 375 are rol de inhibitor în cancerul colorectal și dacă ar putea fi utilizat ca potențial biomarker pentru screening-ul non invaziv în cancerul colorectal. **Metode.** Exozomii au fost izolați și descriși din serul pacienților cu metastaze hepatice diagnosticați cu CRC. Descrierea exozomilor a fost efectuată folosind TEM/SEM. Celulele HCT116 au fost transfectate cu mimici de MicroARN-375, NSM și inhibitori de MicroARN-375. Determinările funcționale au cuprins număratoarea celulelor transfectate pentru 14 zile, determinarea invazivității celulelor transfectate prin camerele de invazivitate cu matrigel, determinarea apoptozei prin citometrie de flux folosind Anexina V-FITC, RT-PCR și testul Western-blott. **Rezultate.** Potențialul crescut proliferativ a fost dovedit pentru celulele transfectate prin inhibitorii de MicroARN-375, în timp ce mimicii MicroARN-375 au scăzut celularitatea. Celulele transfectate cu inhibitorii MicroARN-ului 375 sunt agresive și penetrează membrana bazală. 3.84% din celulele transfectate cu inhibitori de MicroARN-375 au intrat în apoptoză în timp ce 6.45% din cei transfectați cu mimici non-specifici NSM au intrat în apoptoză într-o rată mai mică. RT-PCR pentru expresia proteinei Bcl-2 a arătat că Bcl-2 este inhibat în cazul celulelor transfectate cu inhibitor de MicroARN-375, dar este stimulat și supraexprimat pentru celulele transfectate cu mimicii MicroARN-ului-375, un rezultat confirmat prin testul Western Blott. **Concluzii.** Studiul prezent aduce în prim plan noi rezultate ce sugerează că MicroARN-ul 375 poate juca un nou rol în influențarea căilor de semnalizare responsabile pentru inhibarea evoluției naturale ale celulelor tumorale din cancerul colorectal via căilor mediate prin proteina Bcl-2.

Studiul 3 – Influența MicroARN-ului 194 și MicroARN-ului 1228 asupra profilerării și metastazării cancerului de colon via phospho S6.

Introducere: Chiar dacă incidența cancerului colorectal este în descreștere în Europa, faptul că prevalența acestuia este încă crescută și patogeneza nu este încă complet cunoscută, face ca aceasta neoplazie să rămână un subiect intens cercetat. Scopul acestui studiu este de a investiga rolul MicroARN-ului 194 și 1228 în proliferarea cancerului colorectal și a metastazelor acestuia. **Metode:** MicroARN-ul a fost recoltat de la pacienții cu cancer de colorectal cu sau fără metastaze hepatice și nivele expresiei MicroARN-ului au fost determinate prin qRT-PCR. Determinările au fost efectuate pe liniile celulare HCT116 și au inclus testele qRT-PCR, Western Blott, numărătorile celulare ale celulelor de control și ale celulelor transfectate cu mimicii și inhibitorii microARN-urilor menționate. **Rezultate:** Expresia scăzută a ambelor microARN-uri 194 și 1228 a fost observată la pacienții cu metastaze hepatice comparativ cu pacienții fără metastaze. Număratoarea celulară a arătat rolul inhibitor al MicroARN-ului 195 în momentul în care este stimulată expresia lui și a MicroARN-ului 1228, prin inhibarea expresiei acestuia, rezultate facilitate probabil de inhibarea proliferării celulare. Testul Western-blott a arătat efectul inhibitor al MicroARN-ului 1228 prin mimarea expresiei proteinei phospho S6 și efectul stimulator al MicroARN-ului 194. **Concluzii:** Studiul prezent a deschis noi orizonturi referitoare în special la importanța MicroARN-ului 194 în inhibarea proliferării celulelor cancerului colorectal și arată potențiala lui utilizare ca și biomarker în practica clinică.

Concluzii generale

1. Cancerul colorectal este una dintre cele mai frecvente neoplazii, cu o creștere a numărului de cazuri noi diagnosticate în fiecare an, fiind asociat cu o rate de mortalitate ridicată, în pofida tratamentului optimal.
2. Programele de screening sunt de obicei incluse în ghidurile vestice și internaționale, dar prea puțin utilizate în societățile Est Europene.
3. Opțiunile de screening non-invaziv ar trebui să fie oferite pacienților la risc sau pacienților cu vârsta de screening pentru cancerul colorectal.

4. Colonoscopia flexibilă rămâne cea mai răspândită metodă de screening și diagnostic pentru leziunile premaligne sau maligne ale cancerului colorectal.
5. Utilizarea markerului ACE este utilă în urmărirea post-terapeutică a pacienților cu cancer colorectal dar are o specificitate și sensibilitate redusă în utilizarea lui în screening sau diagnostic.
6. Speciile de ARN circulante non-codate exozom-purtate, în special microARN-urile, au fost descrise fie ca promovând sau inhibând proliferarea celulară, invazivitatea tumorală sau apariția metastazelor.
7. Câteva dintre speciile de microARN ar putea fi folosite în practica clinică fie ca biomarkeri de diagnostic, fie în urmărirea post-terapeutică sau în predicția recidivei.
8. Alte microARN-uri ar putea fi potențiale ținte în inhibarea chimiorezistenței sau promovarea apoptozei celulelor tumorale, astfel facilitând o terapie țintită pentru cazuri selectate de pacienți cu cancer colorectal.
9. Un registru Național de cancer colorectal ar trebui implementat în scopul de a facilita accesul la informațiile privitoare la managementul pacienților, pentru o mai bună urmărire post-terapeutică.
10. Programele naționale de prevenție și informare ar trebui oferite pacienților indiferent de mediul lor de proveniență.
11. Cazurile de agregare familială/leziuni premaligne ale cancerului colorectal sunt necesar a fi urmărite cu atenție în scopul de a detecta leziunile cancerului colorectal în stadii incipiente
12. Bilanțul de extensie lezional preterapeutic al pacienților necesită o mai bună implementare, incluzând: CT TAP cu s.c. iv tuturor pacienților, US abdominală, endo-US (pentru cancerelor rectale), IRM cu secvență DWI (înainte, în timpul și ulterior tratamentului neoadjuvant, în cazul cancerelor rectale), PET-CT (pentru cazuri selecționate, cu mutații genetice sau în situația bolii metastatice), laparoscopie exploratory (în cazuri selecționate). Utilizarea comitetelor de decizie oncologică multidisciplinară (MDT) trebuie efectuată pentru fiecare pacient în parte, nu doar selectiv, indiferent de instituția medicală.
13. Pacienții diagnosticați cu cancer rectal mijlociu/jos, care urmează radiochimioterapie neoadjuvantă, ar trebui urmăriți în timpul tratamentului și la un interval de cel puțin 8 săptămâni după tratament prin IRM cu secvențe DWI; răspunsul patologic complet în aceste cazuri documentate prin IRM cu DWI cu sau fără endo-US, ar putea fi manageriat cu un protocol "wait/watch and see".
14. Procedurile minim invazive pentru cancerul colorectal ar trebui puse la dispoziția tuturor pacienților care nu necesită rezecție multiplă de organ sau fără metastaze la distanță concomitente. Același lucru ar trebui aplicat și în cadrul procedurilor de oncoplastică unde se folosesc tehnicile cu salvarea sfincterului sau tehnicile de umplere pelvină.
15. Raportările anatomo-patologice pentru pacienții cu cancer colorectal ar trebui să includă statusul MSI și statusurile K-RAS/all-RAS încă de la prima biopsie efectuată endoscopic.
16. Prin pierderea pacienților în perioada post-terapeutică, este afectată dramatic rata de supraviețuire globală, afișând un potențial nefavorabil al rezultatelor oncologice ale tratamentului multidisciplinar într-un centru terțiar de oncologie.
17. Rezultate oncologice optime pot fi obținute doar în cadrul scenariului unei echipe multidisciplinare.
18. MicroARN-375 este un inhibitor în multiple neoplazii umane.
19. MicroARN-375 se comportă ca un agent supresor tumoral. Recâștigarea funcției sale ar putea inhiba proliferarea și migrarea tumorală, precum și facilitarea apoptozei celulare în multe tipuri de neoplazii digestive.
20. MicroARN-ul 375 facilitează apoptoza celulelor cancerului colorectal prin căi mediate de proteina Bcl-2.
21. Expresia MicroARN-ului este invers proporțională cu nivelul sanguin al proteinei Bcl-2.
22. Recâștigarea funcției MicroARN-ului 375 ar putea avea semnificație terapeutică în cancerul colorectal și în alte neoplazii de tract digestiv.
23. MicroARN-ul 375 joacă un rol important în alterarea căii natural de progresie celulară în cancerul colorectal, mai ales calea proteinei Bcl-2. Studiile viitoare ar trebui să poată determina nivelele circulante sanguine ale MicroARN-ului 375 precum și să inițieze și să faciliteze un studiu de cohortă al pacienților cu cancer colorectal și metastaze hepatice concomitente. MicroARN-ul 375 se comportă ca un inhibitor tumoral prin recâștigarea funcției sale.
24. MicroARN 194 este inhibat în majoritatea neoplaziilor de tract digestiv.
25. Supraexpresia MicroARN-ului 194 în cancerelor colorectale are efecte inhibitorii asupra proliferării celulare tumorale și a metastazării acestora.
26. MicroARN-ul miR-194 joacă un rol semnificativ în scăderea celularității tumorale, comportându-se ca un inhibitor tumoral. Prin recâștigarea funcției sale ar putea fi util în promovarea terapiei țintite pentru cancerul colorectal, comportându-se ca un agent supresor tumoral.
27. Foarte puține date sunt cunoscute în literatură privind rolul oncogenic al MicroARN-ului 1228 în tumorile solide.

28. Se presupune că, prin supraexpresia MicroARN-ului 1228 într-un context in vitro, se promovează proliferarea celulară și metastazarea, astfel acesta se comportă ca o oncogenă.
29. Calea mediată prin Phospho S6 ar putea fi alterată de către supraexpresia MicroARN-ului 1228 și/sau inhibarea de către MicroARN-ul 194. Terapiile țintite ar trebui fie să restabilească funcția MicroARN-ului 194, fie să inhibe activitatea MicroARN-ului 1228.
30. Prin integrarea și interpretarea rezultatelor obținute de studiul nostru în comparație cu rezultatele oferite de literatura de specialitate, am ajuns la concluzia că microARN-urile circulante au potențialul de a fi folosiți drept biomarkeri pentru diagnosticul și caracterizarea neoplaziilor colorectale, precum și în cadrul predicției potențialului metastazării hepatice ale acestora.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Suntem de părere că teza de doctorat prezentă este una dintre primele astfel de lucrări ale Almei Mater Napocensis, care dezbate rolurile jucate de către speciile de microARN în cancerul colorectal. Mai mult, credem cu tărie că am fost capabili să demonstrăm că două dintre speciile identificate de microARN ar putea să se manifeste ca și supresoare tumorale într-un context in vitro, iar că cealaltă specie se comportă ca o oncogenă în aceleași situații.

Din nefericire nu am fost capabili, din punct de vedere al constrângerilor financiare, să demonstrăm și să implementăm rezultatele obținute in vitro, în modele animale in vivo, conform scopului inițial. Sperăm că vom reuși acest lucru în studiile post-doctorale următoare.

Utilizarea microARN-urilor nu este pe deplin încă înțeleasă, astfel existând numeroase dispute pe această temă. Mai exact, anumite specii de microARN se pot comporta drept agenți supresori tumorali în anumite neoplazii, dar se pot comporta și ca oncogene în alte tipuri histologice de neoplazii. În fiecare zi sunt descrise noi specii de microARN-uri care acționează pe diverse căi, afectând invazia tumorală, proliferarea, migrarea și metastazarea, și alte nenumărate procese metabolice. Căile pe care acestea acționează nu sunt încă pe deplin înțelese.

Exceptând faptul că această teză conține doar rezultate obținute in vitro, un alt neajuns al acesteia ar consta din faptul că speciile biologice recoltate de la pacienții înscriși în studiu provin de la un singur centru terțiar de cancer, astfel nu putem face extrapolări la nivelul altor centre.

Întocmirea acestei teze a facilitat legătura cu mulți cercetători internaționali, doctoranzi sau medici, implicați în cercetarea translațională. Acest lucru poate fi observat prin studiarea articolelor publicate (patru review-uri ale literaturii, trei articole originale, o scrisoare către editor și un poster) toate publicate în cadrul jurnalelor internaționale cu factor de impact mediu și ridicat.

În plus, înrolarea pacienților în cadrul studiilor s-a realizat cu mare ușurință, astfel facilitându-se crearea unei bio-bănci, prima de acest fel (conținând serul/plasma, țesut colorectal sănătos și țesut tumoral al pacienților), disponibil pentru viitoarele dezvoltări și studii.

Using biomarkers for treatment follow-up of oncological patients with colorectal cancer

Ph.D. Student: **Mihai-Ștefan Mureșan, MD**

Ph.D. Coordinator: **Prof. Dr. Alexandru Irimie, MD, Ph.D**



CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. General data regarding colorectal cancer	19
1.1. The anatomy and oncological pathology of the colon and rectum	19
1.1.1. Macroscopic anatomy of the colon and rectum	19
1.1.2. Pathology of colorectal cancer	21
1.2. Epidemiology of colorectal cancer	22
1.2.1. Etiology and risk factors for colorectal cancer	23
1.2.2. Staging of colorectal cancer	27
1.3. The natural history of colorectal cancer	27
2. Multidisciplinary management of colorectal cancer	29
2.1. Colorectal cancer screening	29
2.1.1. Colorectal cancer screening for non-high-risk patients	30
2.1.2. Colorectal cancer screening for high-risk patients	31
2.2. Management of colorectal cancer	31
2.2.1. Management of colon cancer	32
2.2.1.1. Primary localized colon cancer	32
2.2.1.2. Locally advanced resectable colon cancer and locoregional recurrent colon cancer (Stage III-IV)	34
2.2.1.3. Colon cancer with metastatic disease	35
2.2.2. Management of rectal cancer	36
2.2.2.1. Primary localized rectal cancer	36
2.2.2.2. Locally advanced rectal cancer and local recurrent rectal cancer	39
2.2.2.3. Metastatic rectal cancer (Stage IV disease)	40
3. The role of biomarkers in the diagnostic and post-therapeutical follow-up of oncological patients	41
3.1. Biomarkers in oncology	41
3.2. MicroRNAs and their utility in clinical practice	42
3.2.1. MicroRNAs and the microenvironment	44
3.2.2. MicroRNA expression profiles in liver metastases from colorectal cancer	45
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis and Aims	55
2. General methodology	57
3. Study 1 - Post-therapeutic results of multidisciplinary management of colorectal cancer patients in a Romanian tertiary cancer center	59
3.1. Introduction	59
3.2. Aims	60
3.3. Patients and methods	60
3.4. Results	62
3.5. Discussion	83
3.6. Conclusions	86
4. Study 2 - Exosome-Carried microRNA-375 Inhibits Cell Progression and Dissemination via Bcl-2 Blocking in Colon Cancer	87
4.1. Introduction	87
4.2. Aims	88

4.3. Materials and methods	89
4.4. Results	91
4.5. Discussion	100
4.6. Conclusions	101
5. Study 3 - MicroRNA-194 and microRNA-1228 influence colon cancer proliferation and metastasis via phospho S6	103
5.1. Introduction	103
5.2. Aims	103
5.3. Patients and methods	104
5.4. Results	106
5.5. Discussion	113
5.6. Conclusions	115
6. General conclusions	117
7. Thesis' originality and innovation	121
REFERENCES	123
ANNEXES	143
ANNEX 1 - TNM (American Joint Committee on Cancer - AJCC) classification and staging system for CRC (8 th Edition)	

Keywords : colorectal cancer, metastatic niche, biomarkers, exosomes, microRNA/miRNA/miR, oncogene, tumor suppressor, multidisciplinary treatment, tumor progression, tumor invasion

INTRODUCTION

Worldwide, colorectal cancer (CRC) is a significant health problem, being the third most common cancer in men and second in women. In 2016, approximately 600,000 deaths were related to colorectal cancer out of all cancer deaths with more than 100,000 new cases only in the United States(1–3). In Romania, this type of malignancy is the second most frequent cancer in men and third in women(3), with approximately 11,000 new cases prospected for 2016. Baring in mind the fact that only approximately 40% of CRC patients are diagnosed in an early stage with localized disease having a 90% 5-year cancer-specific survival rate, and that about 21% out of the remaining patients are diagnosed in an advanced, metastatic stage of the disease with a dropping 5-year cancer-specific survival to only 10%(3), it is of utmost importance to facilitate an early diagnosis providing good adequate treatment for sometimes such an asymptomatic malignancy. Understanding the molecular mechanisms that govern tumor growth and metastasis is imperative for individualized medicine as well as for future treatment developments.

Since CRC becomes symptomatic only in advanced stages, and screening colonoscopy is not systematically performed worldwide, focus should be placed on an early serologic test, which could be cheap, repetitive, independent, by investigator, which furthermore could itself be used as a screening tool. The only serologic marker, mainly used in the follow-up setting of CRC is CEA (with a moderate specificity and sensibility for early diagnosis, but with good predictability of relapse)(4).

The current trend in modern oncology is based on molecular analysis, which enables the development of diagnostic and therapeutic tools that offer the possibility of individual tailored medicine, that previously have been unavailable.

New strategies are explored to find representative molecules (biomarkers) to predict tumor response. There is increasing evidence for the fact that miRNAs could be key regulators for different basic biological processes, by tightly regulating gene expression. Different cancer pathologies show unique miRNA signatures, however, the prognostic value of miRNAs in metastatic cancers has been scarcely investigated(5). By understanding the molecular and genetic mechanisms by which a carcinoma *in situ* is able to invade through the basal membrane, grow and even disseminate in distant organs evading the host's immune system and systemic chemotherapy, we can develop valuable and applicable future treatments for CRC. The epigenetic events that correlate with a positive feedback between cancer cells and the surrounding fibrous tissue may hold the key answer for many questions regarding early detection and improved management for CRC.

PERSONAL CONTRIBUTION

Hypothesis and Aims

Our **primary hypothesis** is that primary cancers release miRNAs within exosomes transported in the peripheral blood that facilitate the metastatic niche.

Aim 1. Evaluation of the implication of multidisciplinary treatment of colorectal cancer in a Romanian tertiary cancer center.

Multidisciplinary treatment of CRC offers similar post-therapeutic results in a Romanian tertiary cancer center when compared to international reports.

Aim 2. To study the miRNAs within the primary tumor and further on in the released exosomes of patients with CRC with and without liver metastasis, in order to predict whether a specific miRNA is responsible for the development of the liver metastatic niche (oncogene), or reversely, if in fact it suppresses tumor growth, promoting apoptosis and preventing the spread of tumor cells (tumor suppressor).

This **specific aim** of the project focuses to uncovering new biomarkers used for CRC patients' follow-up, after curative surgical treatment or in complete remission after combined therapy, which could be implemented in predicting relapse or potential development of a metastatic niche. The biomarkers chosen to be studied are miRNA species or molecules such as exosomes that are not yet included in any official guideline for CRC follow-up. In fact, the guidelines currently in use do not recommend any kind of molecular markers, except for the carcinoembryonic antigen (CEA). The development of this field is in its infancy and, from this point of view, our study rallies to a great number of other research efforts directed toward the discovery and implementation in clinical practice of new methods of surveillance of the patients with CRC after initial therapy, in order to detect relapses as early as possible. Having access to a microarray platform, allows us to search for new biomarkers besides those already described in literature.

General methodology

No specific general methodology has been used for the elaboration and editing of the current thesis.

Each individual study will have their specific methodology described in the "Materials/Patients and Methods" section. Special consideration should be emphasized on the second and third study, whose methodology resembles in the isolation and description of the exosomes, miRNA species and cell cultures.

After patients' enrollment in the study, with their written consent obtained, their serum/plasma, healthy tissue and tumor tissue sampled were stored at minus 280° C in special recipients in liquid nitric oxide. All patients enrolled in the study for patients which had their primary or secondary cancer treatment performed at "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Oncology Institute (IOCN), Cluj-Napoca, Romania.

All micro-arrays, cell culture, cell migration, invasivity tests, Western-blotting and PCR-arrays, were performed and managed at the Research Center for Functional Genomics, Biomedicine and Translational Medicine, at "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania, according to a written and signed collaborative contract between the author and the Center's Director, Prof. Ioana Berindan-Neagoe, PhD (20/23.04.2015). All the biological fluids, tumor specimens and patients' data were gathered and stored as a bio-bank at the Centers' storage facility.

Study 1 – Post-therapeutic results of multidisciplinary management of colorectal cancer patients in a Romanian tertiary cancer center

Aim. The primary aim of this study was to report the benefits of multidisciplinary treatment of selected patients diagnosed with CRC in a Romanian tertiary-cancer-care-center ("Prof. Dr. Ion Chiricuță" Oncology Institute, Cluj-Napoca, Romania). The secondary aim of this study was to compare the treatment options used for the selected CRC patients to the international comprehensive treatment guidelines and results reported by similar cohort studies. The tertiary aim of this study was to analyze the post-therapeutic outcomes (DFS, OS, local and general recurrence rate) and to associate them to specific disease characteristics. Additional aims of the current study was to identify the limitations and drawbacks of local guidelines and protocols of the management of patients with CRC in comparison to reports available

in the literature, thus establishing future local potential benefits of a more comprehensive approach to CRC patients.

Patients and Methods. After applying the inclusion and exclusion criterias, a total number of 99 patients diagnosed and treated for CRC, were found eligible, from a total number of 331 patients with CRC that have been directed for treatment at “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Oncology Institute, Cluj-Napoca, Romania (IOCN) from January 2014 to January 2015. Descriptive statistic populational data (patients’ gender, age, background reasons for hospital admission, relevant family and personal history for CRC, pre-treatment work-up, surgery, perioperative and adjuvant treatment, morbidity, in/out-hospital mortality, months in follow-up, etc) was centralized using Microsoft® Excel databases and expressed via images such as pies, charts and mean±SD values. DFS, OS was calculated using Mantel Cox logrank test and Kaplan-Meier curves, provided by the same software. **Results.** A higher incidence of CRC was noticed in male patients (60%), coming from an urban background (75%), with a mean age at diagnosis of 60.5 ± 11.9 years (95% CI: 58.1 – 62.9). The mean follow-up interval of the patients was 22.3 ± 10.1 months (95% CI: 12.1 – 48). Only 9% of the patients had a relevant family history for CRC, but 34% had a relevant personal history for CRC, out of which, 8% were labeled as carrying premalignant conditions. The most frequent symptom at admission was blood noticed in stool (39% of the patients). 58% of the diagnosed CRC were situated at the level of the colon, 37% at the level of the rectum and 5% at the level of the recto-sigmoid junction. The mean CEA levels (ng/dl) measured at diagnosis was of 14.4 ± 27.8 ng/dl (95% CI: 7.3 – 21.5). 98% of the patients underwent at least a colonoscopy associated to a contrast-enhanced CT T-A-P. All of the rectal cancer cases had either a pelvic MRI or an EUS performed for optimal staging. Very few patients (6%), with rectal cancers were monitored during and after neoadjuvant treatment using MRI with DWI. A quarter of the cases of colon and rectosigmoid junction tumors were diagnosed with potentially resectable metastatic disease at admission, with the rest three quarters being locally limited cancers. The situation was more favourable in the setting of rectal cancer, where only 11% of the patients presented with concomitant resectable metastases at admission, with 89% of the remaining patients with early or locally advanced disease. Pre-treatment detection of K-RAS/all-RAS mutations has been performed in only 3% of the patients. MSI status (stable, low, high) was not determined pre-operatively in any of the patients from the biopsy recovered specimen. Imaging TNM staging of the tumors was consistent with pathologic TNM staging in over 95% of the cases. For colon and rectosigmoid junction cancers, the therapeutical decision in 83% of the cases was upfront surgery. Only in 10% of the patients, where feasible, concomitant multi-organ en-bloc resections, staged peritonectomies or one-staged liver approach resections were undertaken. Primary histology was in all of the cases adenocarcinoma of specified types. 52% of the tumors had some sort of tumor invasivity (either perineural, intralymphatic, intravenous or a mix of them). Irrespective of primary tumor site, 57% of the cases had a moderately differentiated tumor type. The mean number of lymph nodes harvested, irrespective of type of surgery performed, was 22.5 ± 10.3 lymph nodes (95% CI: 4-63). 10 patients (9% of all CRC patients enrolled in the study; 27% of patients with neoadjuvant treated rectal cancers) had a complete pathological response to neoadjuvant treatment, with the definitive pathology specimen not bearing any residual tumor. The reported postoperative 7-day mortality was 1%, with a 3% 30-day rate. In 72% of the cases, there was no postoperative complication according to the Clavien-Dindo Classification. More than one fourth (27%) of the patients having colon and rectosigmoid junction cancers did not receive any adjuvant therapy after the surgical management of the primary tumor. In the case of rectal tumors, 57% of the patients received adjuvant chemotherapy alone. 14% of the patients with early rectal cancers, who were operated upfront, did not need any adjuvant treatment, whereas 18% of the patients preoperatively staged as early rectal cancer patients, were upstaged pathologically and needed adjuvant CRT. After optimal multidisciplinary treatment, the overall CRC recurrence rate found, in the established follow-up period of time was of 29%, out of which distant metastatic disease was found in 62% (18 patients). The predominant site of distant recurrences was found in the liver alone (57%), followed by either the liver and distant peritoneal (25%), and solitary lung metastases (4%). When comparing DFS, colon and rectosigmoid junction cancers without metastases have a better median survival (16 months) versus same disease bearing metastases at admission (7 months) (p = 0.0278, Log-rank, Mantel Cox Test), with a HR of cancer relapse of 0.26 (95% CI: 0.07-0.86). The same trend can be noticed when comparing non-metastatic rectal cancers (19 months median survival) to rectal cancers presenting metastases at hospital admission (6.5 months median survival) (p = 0.0023, Log-rank, Mantel Cox Test); HR for cancer relapse of 0.036 in favour of early metastatic disease (95% CI: 0.004 - 0.3). In the current case series, 4-year OS for colon and rectosigmoid junction cancers was statistically significant better in the setting of non-metastatic disease (17 months) than for metastatic cancers (7 months) (p = 0.02, Log-rank, Mantel Cox Test), with a higher HR of fatal incidence 0.29 (95% CI: 0.09 – 0.87) disfavouring patients with metastatic disease. A similar situation regarding 4-year OS was noticed when comparing rectal cancers without metastases at diagnosis (25 months), to same disease with metastases found (12 months) (p = 0.005, Log-rank, Mantel Cox Test); HR for death of 0.23 (95% CI: 0.083 – 0.65) when metastases present (Figure 29.). For the 61 patients with known CEA (ng/dl) levels at hospital admission, no statistical relevant linear regression to 4-year OS was found (r² = 0.02, p = 0.25). **Discussion and conclusions.** The results of our populational case series study show that CRC can be treated in a comprehensive case-by-case multidisciplinary manner, with good to excellent post-therapeutical results, in a tertiary cancer center. Even so, the present study has raised significant nation-

wide issues that should furthermore raise awareness for the diagnosis, treatment and follow-up of CRC. Nevertheless, even with such worrisome remarks, CRC treatment should be tailored to each and every patient's needs, in order to facilitate optimal disease and recurrence control and ease of symptoms.

Study 2 - microRNA-375 is responsible for Cell Progression and Dissemination inhibition via Bcl-2 Blocking in Colon Cancer

Aims. The aim of the study was to identify whether miR-375 is indeed down-regulated in metastatic CRC and if it could be considered as a potential minimally invasive prognostic biomarker for CRC. **Methods.** Exosomes were isolated and characterized from patients with liver metastasis from CRC. The characterization of exosome was performed using TEM/SEM. HCT116 cells were treated with miR-375 mimic, NSM and miR-375 inhibitor. Functional assays included cell counting assay for 14 days, Matrigel invasion assay, apoptosis assay by flow cytometry using Annexin V-FITC, RT-PCR and Western blotting. **Results.** Increased proliferation potential was proven for the cells transfected with miR-375 inhibitor, while the miR-375 mimic decreased the cell number. The cells transfected with the miR-375 inhibitor are aggressive and cross the membrane; 3.84% of the cells transfected with the miR-375 inhibitor entered apoptosis, while 6.45% of those transfected with the non-specific mimic were in programmed cell death, less than those transfected with the microRNA. RT-PCR for Bcl-2 expression showed that Bcl-2 is down-regulated for miR-375 inhibitor and up-regulated for the miR-375 mimic, a result confirmed by Western blotting. **Conclusion.** The present study brings to the forefront new data that suggest miR-375 as a new player in controlling the pathways responsible for inhibiting the natural history of CRC tumor cells, via the Bcl-2 pathway.

Study 3 - MicroRNA-194 and microRNA-1228 influence colon cancer proliferation and metastasis via phospho S6

Introduction: Although colorectal cancer has a descending incidence trend in Europe, because of its' still high frequency and not fully understood pathogenesis, it remains a subject of intense research. The aim of this study was to investigate the role of microRNA-194 and microRNA-1228 in colorectal cancer proliferation and metastasis. **Methods:** RNA was extracted from patients with colorectal cancer and with or without hepatic metastasis and microRNA expression levels were determined through qRT-PCR. Assays were performed on HCT116 cell line and included qRT-PCR, western blotting, cell counting on control and on transfected cells. **Results:** Lower expression of both microRNA-194 and microRNA-1228 was observed in patients with liver metastasis versus patients without liver metastasis. Cell counting showed the inhibitory role of microRNA-194 upregulation and microRNAs-1228 downregulation on inhibiting cell proliferation. Western blotting showed the inhibitory effect of microRNA-1228 inhibitor and the stimulatory effect of microRNA-194 and microRNA-1228 mimics on phospho S6 expression. **Conclusion:** The present study shed more light regarding the importance of microRNA-194 downregulation in colon cancer and suggests it as a potential clinically useful biomarker.

General Conclusions

1. CRC is one of the most prevalent malignancies, with an increasing number of new cases each year, bearing an alarming mortality rate, despite optimal treatment.
2. Screening programs are usually included in Western national and international guidelines, but are scarcely used in Eastern European societies.
3. Less invasive screening options should be offered to patients at risk or at age of being screened for CRC.
4. Flexible colonoscopy (IFE) remains the most widespread screening and diagnostic tool for premalignant or malignant lesions in CRC.
5. CEA is reliable in the follow-up setting but has low sensitivity and specificity in the screening or diagnostic scenario.
6. Exosome-carried circulating non-coding RNAs species, especially microRNAs have been shown to either promote or inhibit oncogenesis, cell proliferation, tumor invasivity and metastasis.
7. Some microRNAs species could be used in the clinical setting either as biomarkers for diagnosis, follow-up, or relapse prediction.
8. Other microRNAs could be potential targets in down-regulating chemoresistance or promoting tumoral cells' apoptosis, thus facilitating a more tailored targeted therapy for selected CRC patients.

9. Nation-wide CRC registries should be implemented in order to facilitate valuable access to patients' information and could aid physicians in the follow-up of their treated patients.
10. National prevention and information programs should be offered to patients irrespective of their upbringing.
11. Family clusters of CRC/premalignant CRC lesions need to be followed more often, in order to detect CRC lesions earlier.
12. More thorough pretreatment diagnosis tools need to be homogeneously offered to all patients – including intravenous/double contrast enhanced CT T-A-P, abdominal US, EUS (in rectal cancers), MRI with DWI (before, during and after neoadjuvant treatment for rectal cancers), PET-scan (in selected cases), exploratory laparoscopy (in selected patients). MDTs need to be the rule, not the exception, irrespective of institution.
13. Patients diagnosed with mid/low rectal cancers, offered neoadjuvant chemoradiation should be followed during and at an interval of at least 8 weeks after the neoadjuvant treatment using MRI with DWI sequences; complete pathological response in such cases, documented by MRI with DWI scans with or without EUS could be managed on a “wait/watch and see” protocol.
14. Minimally invasive procedures, both for colon and rectal cancers need to be offered on a regular basis to patients not requiring multiorgan resection or without concomitant distant metastases. Same can be pronounced regarding oncological procedures where either sphincter-sparing techniques or pelvis-filling techniques should be used more often.
15. Pathology reports for CRC patients should include MSI status and K-RAS/all-RAS statuses starting from the first biopsy taken endoscopically.
16. Loosing patients in the follow-up setting dramatically affects the survival rates and negatively affects the potential favourable oncological results of a multidisciplinary treating tertiary-cancer-center.
17. Excellent oncological results can only be obtained in a multidisciplinary team scenario.
18. miR-375 is downregulated in multiple human cancers.
19. miR-375 acts as a tumor suppressor agent. Restoring its function could inhibit tumor proliferation and migration and furtheron, facilitate apoptosis of various digestive tract cancer cells.
20. miR-375 facilitates CRC cells' apoptosis by mediating Bcl-2 pathways.
21. miR-375 expression inversely correlates with Bcl-2 levels.
22. Restoration of miR-375's expression to a normal level might be of therapeutic significance in CRC and in other digestive tract malignancies.
23. miR-375 plays an important role in altering the pathways of natural CRC cells' progression, especially the Bcl-2 pathway. Future studies should also comprise in-vivo determination of circulating levels of miR-375, thus initiating and facilitating a prospective populational cohort study of patients with CRC and concomitant liver metastases. miR-375 acts as a tumor suppressor if upregulated.
24. miR-194 is downregulated in most of the digestive tract's cancers.
25. In CRC, miR-194's overexpression has inhibitory effects on cell proliferation and metastasis.
26. miR-194 plays a significant role in decreasing tumor cellularity, acting as a tumor suppressor. Restoring its function could be of aid in promoting targeted therapy for CRC, this miR acting as a tumor suppressor agent.
27. Very little data is available regarding the oncogene role miR-01228 could play in solid tumors.
28. To this day, it is suspected that, miR-1228's upregulation in an in vitro context promotes cell proliferation and metastasis; this miR acting as an oncogene.
29. Phospho S6-mediated pathway could be altered by miR-1228 overexpression and/or by miR-194 downregulation. Targeted therapy should either restore miR-194's function, or inhibit miR-1228's activity.
30. By integrating and interpreting the results obtained in our study with the ones presented in literature, we concluded that circulating microRNAs have the potential to be used as biomarkers for the diagnosis and characterization of colorectal malignancies and their liver metastasis potential.

Thesis' originality and innovation

It is to our best belief that this current thesis is one of the first of its kind in our Alma Mater debating and discussing the roles played by microRNAs species in CRC. Furthermore, we wholeheartedly believe that we have been able to demonstrate that two of the identified species of microRNAs could act as tumor suppressors in an in vitro context and one other specie acts as an oncogene in a similar setting.

Unfortunately, we have not been able, do to financial constraints, to demonstrate and implement the in vitro results, in an in vivo animal model, as primarily planned. We plan to do so in future post-doctoral studies.

The microRNAbiome is not completely understood and many disagreements exists. To be more precise, some microRNA species could act as tumor suppressor agents in some cancers, whereas they could act as oncogenes in other

malignant histologies. Everyday, newer species of microRNAs are described with several altered pathways, affecting tumor invasion, proliferation, migration and metastasis, and several other metabolic processes. Their pathways are not always clearly understood.

Except the fact that this thesis has only limited in vitro results, another identified limitations of the current paper is that the biological specimens withdrawn from the enrolled patients come from a single tertiary-cancer-center. No multicentric extrapolations can thus be made.

This thesis has brought the advantage of facilitating multiple connections and networks with international researchers, PhD students and doctors, involved in translational research worldwide. This can be noticed when looking over the amount of published data (four scientific reviews, three original articles, one letter to the editor and one poster), all in peer-reviewed international journals with medium-high impact factors.

Furthermore, the enrollment of the patients has been very quick and fruitful, thus facilitating the creation of the first of its kind CRC biobank (with serum/plasma, healthy colorectal and tumoral tissue), available for further development and future studies.