

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

Etapa 1/2012

Conform Planului de realizarea al proiectului, pentru etapa 1/2012. proiectul a avut urmatoarele obiective:

- Particularități ale riscului, incidenței, evoluției și mortalității pentru cancerul mamar și cancerul de colon – aspecte generale și particulare pentru România;
- Actualizarea conceptelor și ale metodologiilor specifice de investigare ale particularităților molecular-genetice la om și animale;
- Modele de selecție ale cazurilor de interes, prin evaluarea comparativă ale datelor clinice și de laborator la om și animal. Inițierea procesului de colectare de probe, pe baza criteriilor stabilite
- Actualizarea conceptelor și tehnologiilor de fabricație pentru structuri de tip array
- Conceperea de sonde specifice pentru structuri de tip array pentru cancerul de sân
- Dezvoltarea infrastructurii
- Diseminarea rezultatelor: comunicări științifice
- Management de proiect. Organizarea echipelor de coordonare ale proiectului (administrativă, științifică și economică) și a sit-ului proiectului.

Obiectivele anterioare mentionate au fost realizate, datele si rezultatele concrete obtinute in cursul derularii fazei fiind prezentate in continuare.

Particularități ale riscului, incidenței, evoluției și mortalității pentru cancerul mamar și cancerul de colon – aspecte generale și particulare pentru România

Cancerul reprezinta una dintre principalele forme de boala din lume, fiind caracterizat prin valori extrem de ridicate atat sub aspectul incidentei, cat si al mortalitatii, cu numeroase implicatii si consecinte pe plan social, economic, financiar si de alta natura, inclusiv juridica.

Ultimele date analizate complet pe plan mondial dateaza din anul 2008, fiind in curs de prelucrare datele pentru urmatorii ani.

Ca *incidenta* s-a estimat ca in anul 2008 au fost inregistrate 12,7 milioane noi cazuri, cele mai frecvente forme fiind: cancerul pulmonar (la barbati reprezentand 16,5% din noile cazuri), cancerul colorectal si cele de stomac - forme intalnite la ambele sexe. Pentru femei, principala forma de cancer identificata a fost cancerul mamar - cca 23% din noile cazuri. Numarul total de persoane cu boala canceroasa (cazuri noi + cazuri anterioare in viata) depasea, pe plan mondial, peste 40 milioane cazuri, ceea ce reprezinta populatia unei tari considerate deja mare!

Mortalitate: Cancerul reprezinta principala cauza de deces, in anul 2008 fiind inregistrate 7,6 milioane de decese - aproximativ 13% din total, cele mai numeroase decese fiind inregistrate pentru cancer pulmonar, stomac, ficat, colorectal (ambe sexe) si mamar - pentru femei.

Tendinte

Cancerul este considerat, paradoxal, a fi, mai degraba, o caracteristica a tarilor dezvoltate - zona denumita uneori si "lumea vestica", aceasta caracteristica fiind datorata, in primul rand, sperantei de viata mult mai ridicata din aceste tari (valorile de referinta pentru aceste tari fiind, potrivit Organizatiei Mondiale a Sanatatii - O.M.S., de 80 ani pentru barbati si respectiv, de 82,5 ani, pentru femei). Cancerul este, in mod cert, o boala care este dependenta de varsta, majoritatea cazurilor fiind inregistrate peste 45 - 50 ani, cauza principala a acestei dependente fiind acumularea treptata de modificari la nivel genetic, dar si datorita cresterii gradului de expunere la factori de risc externi. In aceste estimari trebuie insa avut in vedere ca pentru multe tari mai putin dezvoltate, exista date incomplete privind incidenta bolii, multe cazuri fiind depistate doar la deces, sau nici atunci.

Oricum se apreciaza ca:

- pentru tarile dezvoltate se va produce o scadere atat a incidentei, in special ca urmare a aplicarii unor metode de preventie, precum si a mortalitatii, ca urmare a utilizarii de metode performante de terapie.
- pentru tarile mai putin dezvoltate, pe masura dezvoltarii ("vesternizarii"), se vor inregistra cresteri semnificative atat ale incidentei, cat si ale mortalitatii prin cancer. Daca pentru tarile dezvoltate curbele de crestere se vor aplatiza, sau chiar vor avea cresteri negative (scaderea numarului de cazuri pentru anumite forme de cancer), pentru celelalte tari curbele prezinta pante de crestere mult mai accentuate, situatie in care se afla si Romania. In prezent, aceste tari inregistreza, din total mondial de cazuri, valori de 47% - la incidenta si respectiv, 55% - la decese (de remarcat procentul mult mai ridicat al deceselor!). Prin studii comparative cu evolutia inregistrata in tarile dezvoltate, se apreciaza ca se vor inregistra scaderi ale curbelor de incidenta pentru cancerul de col uterin si cele stomacale, dar vor creste valorile pentru: cancerule colorectale - la ambe sexe, cancerul mamar - la femei si cel de prostata - la barbati. Scad astfel numarul de cazuri in care un factor important este prezenta unor infectii anterioare (cancerul de col), crescand, in schimb, cele asociate cu factori hormonal si, nu in ultima instanta, asociarii factorilor genetici.

Tinand cont de aceste tendinte, se estimeaza, ca de la cele 12,7 milioane cazuri nou inregistrate in anul 2008, in perioada urmatoare, in special ca urmare a cresterii numarului de cazuri in tarile mai putin dezvoltate, pentru acestea cresterea prevazuta fiind de 81%, fata de numai 69% in tarile dezvoltate, in anul 2030 se vor inregistra cca 22 milioane noi cazuri (valoare egala cu populatia Romaniei!).

Prevalenta (nr. cazuri diagnosticate anterior si aflata in viata la data analizei; de obicei se folosesc valorile la 5 ani)

In anul 2008, mai erau in viata, 29 milioane cazuri anterioare, dintre care, cele mai multe au fost reprezentate de:

- cancerul mamar, la femei: 5,2 milioane;
- cancer colorectal (ambe sexe); 3,3 milioane;
- cancer prostata (barbati); 3,2 milioane.

Daca parametrii de caracterizare ai bolii mentionati anteriori (incidenta, mortalitate, prevalenta) sunt utilizati de mult timp, mai recent, O.M.S. si alte organisme - IARC Lyon, din dorinta de a sublinia si mai mult semnificatia si consecintele bolii canceroase, au introdus un nou parametru: *Disability Adjusted Life Years*, care s-ar putea traduce prin *Pierderi de ani sanatosi*, care reprezinta valoarea totala obtinuta prin insumarea numarului de ani pierduti ca urmare a decesului prematur - anterior valorilor de referinta mentionate mai sus; se exprima ca valori absolute sau ca valori standardizate prin raportare la 100.000 locuitori.

Pentru anul 2008 s-au calculat valori de 169,3 milioane ani, contributia cea mai ridicata fiind atribuita cancerulelor colorectale, plaman (ambe sexe), mamar (femei) si prostata (barbati).

Factori de risc

De departe, fumatul este principalul factor de risc, nu numai pentru cancerul pulmonar, ci și pentru alte forme de cancer. Astfel, pentru anul 2008, se considera ca cca 22% din total decese prin cancer au avut ca factor de risc primar fumatul, pentru cancerul pulmonar procentul fiind, evident, mult mai ridicat: 71% din decese (aprox. 1 milion), dar și alte forme de cancer, inclusiv cele mamar pot fi induse, printre alți factori, de fumat.

Un alt factor de risc major este reprezentat de prezenta infecțiilor anterioare - 2,1 milioane (16,4%) din noile cazuri, în anul 2008, fiind atribuite unor astfel de infecții, în special cu *Helicobacter pylori*, virusurile hepatitei B and C și virusul papiloma uman, întâlnite (însumat) în 1,9 milioane cazuri de cancer de col uterin, gastrice și hepatice. Procentele de cazuri atribuite acestor factor sunt mult mai ridicate în țările mai puțin dezvoltate: 23,4% din total, comparativ cu numai 7,5% pentru țările dezvoltate.

Alți factori considerați, la scară globală, sunt: comportamentul reproductiv (transmisii virale), utilizarea de hormoni, consumul/dieta (consumul de carne roșie, fibre, abuzul de alcool), obezitatea, activitatea fizică, toate acestea fiind asociate, în special, cu cele două forme de cancer care fac obiectul proiectului: cancerul mamar și cel colorectal. Pentru anumite forme de cancer se iau în considerare și expunerea profesională sau la radiație - în special cea solară.

Deși factorii genetici - așa cum se ve sublinia mai jos în cuprinsul raportului, sunt, în momentul de față, unanim recunoscuți ca fiind implicați atât în apariția, cât și evoluția bolii canceroase, datele numerice generale și specifice, pentru anumite forme de cancer, sunt încă discutate sau chiar absente. Aceasta situație se datorează faptului că, deși recunoscuți ca factori semnificativi, mulți dintre aceștia au fost identificați numai în ultimii 10 - 20 ani, unii noi fiind în curs de identificare, iar datele acumulate în timp sunt încă insuficiente și neconfirmate de timp; nu trebuie uitat nici faptul că aceste studii sunt, din punct de vedere experimental, extrem de dificile și, în același timp, extrem de costisitoare.

Cancerul mamar

Cancerul de san este o boala care afecteaza, cu o frecvență foarte mare, femeile din întreaga lume, se situează pe locul primul în incidența și reprezintă, pentru multe țări primul caz de deces prin cancer la femei. Deși numărul de decese în țările dezvoltate a scăzut, ca urmare a depistării precoce, în faze curabile, urmare a introducerii de screening mamografie și utilizarea de chimioterapie intensivă și mai tratament adjuvant hormonal (CA, CAT, CMF, etc) sau radioterapie, este estimată că între 1/12 - 1/8 femei vor dezvolta boala în timpul vieții lor, astfel încât incidența chiar și în țările dezvoltate continuă să crească. Situația este și mai dramatică în țările mai puțin dezvoltate, unde incidența a fost, în general, mai mică, dar este acum în creștere rapidă. Pentru anul 2008 - ultimul an cu date clare privind incidența cancerului și mortalitatea, statisticile arată ca la nivel mondial, la femei, aproximativ s-au înregistrat 1,38 milioane de cazuri noi (primul loc), iar numărul de decese a fost de aproape 460 000 (primul loc) (cf. OMS și IARC Lyon - [www - www.iarc.fr/](http://www.iarc.fr/) GLOBOCAN). Numarul cazuri de cancer la barbati este mic (sub 1%), dar sunt mai agresive.

La femei, în UE, valorile pentru același an au fost: incidența: 333 000 (primul loc), mortalitatea: aprox. 90000 (primul loc).

Pentru România, numărul de cazuri noi la femei a fost de 7.929 (aproximativ 24,1% din totalul cazurilor, locul I), iar mortalitatea a fost de 3.100 (16,44% din totalul deceselor de cancer, locul I); trebuie să se observe existența unui procent mai mare de decese raportate la incidența (39,1%) decât media mondială și, în special, în UE, probabil ca rezultat al bolii detectarea în stadii mai avansate.

Cum s-a menționat anterior, curbele de creștere a numărului de cazuri noi, ca și decese au pantă mai accentuate față de țările mai dezvoltate. Astfel pentru perioada 2000 -2008, numărul de noi cazuri a fost:

2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2008
4.816	6.659	5.792	5,567	5.785	5.772	5.594	7.929

Cancerul de colon

Cancerul de colon (denumit si "cancer sau carcinom colorectal" - CRC) este una dintre cele mai comune forme de tumori maligne, care, se caracterizeaza si prin numarul mare de decese ca urmare a metastazelor.

Același studiu menționat GLOBOCAN indica următoarele date privind CRC:

- total glob: barbati: incidența: 664.000 (locul: 3), decese: 320.000 (locul 4), femei: incidenta: 571.000 (locul: 2), decese: 289.000 (locul: 4), total: incidența: 1.235.000 (locul: 3) decese: 609.000 (locul: 5).
- UE: barbati: incidența: 183.000 (locul: 3), decese: 80.000 (locul 2), femei: incidenta: 151.000 (locul: 2), decese: 69.000 (locul: 2), total: incidența: 334.000 (locul: 1), decese: 149.000 (locul 3);
- România: barbati: incidența: 4.554 (locul: 2), decese: 2.294 (locul: 2); femei: incidenta: 4.142 (locul: 2), decese: 2.884 (locul: 2); total: incidenta: 8.696 (locul: 2), decese: 8.696 (locul: 2).

Din datele prezentate se poate observa ca cele doua forme de cancer sunt forme majore de boala canceroasa, atat sub aspectul incidentei, cat si al evolutiei defavorabile, aceasta situatie, intalnita, conform datelor prezentate, si in Romania, fiind unul dintre factorii determinanti in alegerea proiectului de cercetare si ale obiectivelor sale.

Daca la om exista organisme care colecteaza, centralizeaza si analizeaza situatia privind incidenta, mortalitatea, factori de risc etc. in diverse forme de cancer, atat la nivel national - registre nationale de cancer, cat si international, in cazul animalelor, situatia este departe de aceasta situatie. Exista, cei drept, tendinte in acest sens, inclusiv de crearea a unor registre regionale sau chiar nationale, dar inca aceasta reprezinta mai degraba a dorinta decat o realitate. Sunt date mai certe in previnta animalelor crescute in ferme, pentru carne sau lapte, dar in ceea ce priveste animalele crescute individual, in curte, datele sunt mai greu de obtinut si centralizat. Aceasi lipsa de date generale se inregistreaza si in ceea ce priveste animalele de companie, cele mai numeroase fiind cainele si pisica. Daca in trecut se acorda a atentie crescuta numai animalelor de ferma, in prezent a crescut enorm interesul pentru animalele de companie, din mai multe motive:

- cresterea exploziva a numarului de animale de companie - in SUA se estimeaza ca raportul dintre animal de companie / om se apropie de 1/3!; chiar daca nu s-au atins aceste valori, fenomenul de crestere este intalnit si in Romania;
- cresterea duratei de viata a animalelor; cum si la animale exista o relatie directa intre varsta si incidenta bolii canceroase, creste implicit si numarul de animale bolnave de cancer;
- cresterea adresabilitatii la medic a detinatorilor, cu solicitarea de abordare terapeutica multidisciplinara; daca in trecut adresabilitatea era aproape exclusiva pentru extirparea tumorii prin interventie chirurgicala, in prezent creste spectaculos numarul de cazuri in care se asociaza chimioterapia sau radioterapia, cu cresterea corespunzatoare a consumului de medicamente sau de aparatura destinata iradierii (care trebuie si ele specializate !);
- poate cel mai important aspect care trebuie luat in calcul, mai ales din ceea ce priveste proiectul de cercetare este dezvoltarea studiilor la nivel molecular/genetic. Desigur, inca de la inceput, alaturi de studiile pe probe umane - limitate ca numar si, mai ales, ca posibilitati de corelare a expresiei genetice cu diverse substante potential antioncogene, numeroase studii au fost dezvoltate pe modele animale, in special soarece sau sobolan, alaturi de studiile pe culturi celulare. Chiar daca aceste studii, foarte numeroase si fara indoiala, necesare si in prezent, ele s-au dovedit a avea multe limite:
 - culturile celulare, realizate *in vitro*, sunt lipsite de prezenta organismului viu in ansamblul sau, si implicit, a raspunsurilor organismului ca un intreg, cum ar fi printre altele, raspunsul imun, extrem de important atat in controlul aparitiei celulei transformate, tumorale, cat si al evolutiei bolii sau a raspunsului la tratament.
 - evident aceste deficiente sunt in buna masura eliminate in cazul utilizarii animalelor de experienta, dar si in acest caz, treptat, odata cu cresterea numarului de studii s-au constatat diferente tot mai accentuate, mai ales la nivel genetic intre datele obtinute pe aceste animale si cele de la om.

In schimb, odata cu dezvoltarea investigatiilor pe cazuri de cancer la animale de companie, in special canide, s-a constatat ca diferentele se estompeaza, astfel ca studiile realizate pe acest grup de animale pot deveni un model pentru cancerul uman (vezi, spre exemplu: .

exemplu: R.Klopfleish, D.Lenze, M.Hummel, A.D.Gruber - Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles, BMC Cancer, 10,618-628,2010).

Similar situatiei la om, la caini (femele) forma majora de cancer este cea mamara, datele existente in diverse tari europene indica valorile care variaza de la 19% pana la 70% din total cazuri de cancer depistate:

- Danemarca (intreaga tara): 19% din total 1.878 cazuri;
- Norvegia (intreaga tara): 30% din total 14.401 cazuri;
- Italia (regiunea Venetia): 56% din total 1.269 cazuri;
- Italia (regiunea Genova): 70% din total 3.303 cazuri.

In Romania, in conditiile lipsei unor registre nationale exista date locale la nivelul diverselor centre de tratament veterinar. La Partenerul 2 - Institutul de Medicina Comparata au fost inregistrate, in perioada 2006 - 2012, 76 cazuri de cancer mamar, dintre care, 75 - au fost maligne si doar unul - benign. Au predominat, ca forme: carcinomul vegetant papilifer (25 cazuri), adenocarcinomul solid (18 cazuri) si adenocarcinomul vegetant (7 cazuri).

In concluzie, forma de cancer aleasa pentru studii, la animale, reprezinta un interes deosebit, atat datorita frecventei, cat si datorita informatiilor pe care le poate oferi pentru intelegerea mecanismelor molecular/genetice implicate in aparitia si evolutia bolii, ca si in dezvoltarea schemelor de tratament.

Desigur, situatia prezentata - numarul mare de cazuri de cancer, in special la om, dar si pentru animale, au determinat intensificarea studiilor care incearca sa realizeze o abordare cat mai extinsa, urmarind printre altele:

identificarea factorilor generatori ai bolii - este unul dintre motivele dezvoltarii studiilor de oncologie comparata, pe animale de companie, in buna masura acestea fiind expuse la aceeasi factori de risc cu care se confrunta si posesorul.

detalierea mecanismelor implicate in aparitia si evolutia diferitelor forme de cancer; in ultimii ani accentul a fost pus pe mecanismele molecular/genetice; este de notat ca fata de sperantele initiale, generate printre altele de "descifrarea" genomului uman, finalizata in anul 2000, treptat s-a constatat ca situatia reala este mult mai complexa; astfel au fost identificate, la nivelul aceleiasi gene prezenta pana la 300 de modificari/mutatii, fiecare cu consecinte diferite asupra aparitiei sau evolutiei cancerului.

identificarea de noi agenti ce pot fi utilizati in chimoterapia cancerului; multi dintre acestia au fost dezvoltati pe baza studiilor care au vizat modificarile genetice produse in cancer, agentul terapeutic avand ca tinta biologica gena/proteina modificata;

perfectionarea celorlalte metode de tratament - chirurgie, radioterapie si altele care incearca sa treaca de la o abordare generalista spre forme particularizate bazate, in buna masura, pe date furnizate de investigati la nivel genetic;

In mod cert insa, cu toate ca studiile si metodologiile mentionate au condus la cresterea spectaculoasa a numarului de evolutii pozitive, ajungand la procente de peste 90% in anumite forme de cancer, mai ales daca interventia se realizeaza in faze incipiente bolii (stadii 0 / I), raman totusi, cum rezulta si din datele prezentate anterior, valori ridicate ale incidentei si mortalitatii prin cancer, astfel ca principala cale prin care se spera reducerea acestor nivele este preventia.

Legat si de acest termen - preventie - la ora actuala acesta a evoluat si nuanatat. Daca in urma cu 20 - 30 ani preventia era vazuta ca o metodologie de:

identificare si de limitare / pana la eliminare / la expunerea la agenti oncogeni chimici, fizici sau biologici;

de depistarea a prezentei unor manifestari benigne / premaligne sau a celor maligne in stadii incipiente (mamografie pentru cancerul mamar, test Papanicolau, pentru cel de col uterin, etc)

in prezent, pe baza acelorasi studii care au vizat modificarile genetice care au demonstrat ca, de multe ori, se produc astfel de modificari si pe parcursul ca raspuns la tratament sau al evolutiei

bolii, multe dintre aceste modificări molecular/genetice precedent uneori cu luni de zile, evenimentele clinice care pot depistate prin alte metode de investigare.

În aceste condiții, termenul generic de "prevenție" a fost subdivizat în mai multe categorii - trebuie precizat că acestea nu sunt identice în diverse articole sau chiar organisme internaționale, dar diferențele nu sunt majore. Cel mai adesea se discută, în momentul de față despre:

prevenție primară - în general corespunde cu "prevenția" prezentat mai sus, respectiv vizează identificarea factorilor de risc, a mecanismelor de acțiune ale acestora, reducerea expunerii și respectiv, detectia bolii în faze incipiente;

prevenția secundară - care constă în identificarea factorilor care favorizează reapariția bolii (recurența) sau evoluția spre stadii avansate, cu controlul, pe cât posibil al acestor factori;

prevenția terțiară - urmărește controlul evoluției spre forma cea mai avansată de boală - forma metastatică, cea mai agresivă, cu procente ridicate de evoluții defavorabile. Și pentru aceste etape au fost identificate mecanisme și factori specifici care favorizează sau chiar determină procesul de metastazăre.

Aceste abordări, în special mai noile forme de prevenție, secundară și terțiară reprezintă una dintre direcțiile predilecte ale personalizării și eficienței tratamentului în cancer. Desigur, sunt necesare, în continuare, eforturi considerabile în acest sens, atât umane, cât și materiale, căci trebuie:

identificați factorii de progresie a bolii și nuanțate efectele lor;

realizarea de corelații între diverșii factori, atât la nivel molecular ("scoruri"), cât și clinic;

identificarea unor noi agenți și modificarea/adaptarea căilor de tratament.

*Prin studiile pe care le vizează proiectul de cercetare 4/2012 răspunde, în bună măsură acestor solicitări. Astfel, genele *brca1* și *brca2* - care fac parte din categoria genelor supresoare, sunt responsabile de controlul inițierii cancerului mamar și a celui ovarian, identificarea unor mutații produse la nivelul acestor gene intrând astfel în categoria prevenției primare. A doua genă investigată ras este implicată de evoluția unor forme de cancer mamar și respectiv, de colon - modificările (mutațiile) decelate permițând, printr-o atât obținerea de informații suplimentare despre boală, cât și o particularizare a tratamentului.*

Actualizarea conceptelor și ale metodologiilor specifice de investigare ale particularităților molecular-genetice la om și animale

Apariția și evoluția unei tumori sunt caracterizate prin modificări la nivel celular și molecular reliefate, printre altele, de apariția sau amplificarea nivelului de expresie al unor componente moleculare specifice tumorale: oncogene și proteinele transcrise de acestea – oncoproteinele, gene supresoare, factori imuni, etc. Aceste modificări pot fi evidențiate prin studii realizate la nivel molecular și celular sau al modificărilor macroscopice produse la nivelul țesuturilor, evidențiable prin determinări clinice și paraclinice: ecografie, tomografie computerizată, RMN, mamografie, etc. Dacă aspectele generale ale acestor modificări sunt mai bine cunoscute, anumite aspecte individuale care să se regăsească într-un tratament individualizat corespunzător constituie încă un domeniu de studiu. De asemenea, corelațiile dintre diversele determinări, în special între cele clinice și cele paraclinice, mai ales unele la nivel molecular, (nivelul de expresie al genelor supresoare, al oncogenelor) nu sunt întotdeauna foarte clare și, nu de puține ori sunt chiar divergente, ceea ce îngreunează, în mod evident, atât stabilirea diagnosticului, cât și a tratamentului și prognosticului. Pornind de la aceste considerente, studiul realizat a urmărit, în mod deosebit, evidențierea criteriilor de corelare între investigațiile clinice și paraclinice uzuale – inclusiv cele de tip imagistic: mamografie, ecografie, scintigrafie și cele care pot fi încadrate în categoria "factorilor moleculari", evidențiați prin modificarea expresiei (reacției) imunologice tumoră-gazdă și al expresiei unor markeri tumorali, considerați ca reprezentativi pentru anumite nivele și forme de cancer al glandei mamare. Fiind de acord cu abordările moderne din domeniu, este menționat rolul unor oncogene (ras - abordată în proiect), gene supresoare (p53, BRCA1, BRCA2, etc) atât în apariția, cât și în evoluția cancerului mamar și, derivate din acestea, stabilirea căilor de tratament; subliniem importanța acestor determinări – mai ales pentru individualizarea tratamentelor.

Pentru realizarea investigatiilor la nivel molecular s-au dezvoltat un numar mare de tehnici experimentale, unele dintre acestea realizandu-se in sisteme automate: spectrul este foarte larg si cuprind de la "clasicele" metode spectrofotometrice, cromatografice sau electroforetice, continuand cu cele de tip ELISA sau corespondentul acestora bazat pe substante marcate radioactiv, metodele de tip imunohistochimic si terminand cu cele foarte avansate in care pot fi incadrate metodele de tip citometrie in flux, PCR, secventiere, array, fiecare dintre ele oferind date care incearca sa ofere o imagine cat mai completa asupra aspectelor moleculare, in special al expresiei genice si, mai ales a modificarii acesteia produsa la nivel tumoral in raport cu tesutul normal.

In buna parte, toate metodele mentionate sunt utilizate in cadrul colectivelor care participa la realizarea proiectului, in special in cadrul IOB.

In cele ce urmeaza vom prezenta cateva dintre aceste metode, insistand asupra celor din categoria "avansata" si detailand anumite particularitati ale acestor metode intalnite in cadrul IOB.

Modele de selectie ale cazurilor de interes, prin evaluarea comparativă ale datelor clinice și de laborator la om și animal. Inițierea procesului de colectare de probe, pe baza criteriilor stabilite

In cadrul primei etape a proiectului au fost definitivate criteriile de includere in studiu, tinand cont atat de datele din literatura privind cele doua categorii de gene ce vor fi investigate in etapele urmatoare: brca si ras.

Astfel, la om, pentru genele brca s-a decis sa fie inclusi in studiu pacienti si rude ale acestora cu urmatoarele restrictii: pacientul mai are cel putin o ruda de pana la grad IV cu cancer mamar sau ovarian, iar, la data intrarii in studiu, pacientul nu a urmat forme de chimio- sau radio-terapie. Se vor colecta atat probe sanguine (pacienti si rude), cat si probe tumorale recoltate prin interventie chirurgicala.

Pentru cazurile de cancer de colon, pentru care se vor utiliza numai probe tumorale, vor fi inclusi pacienti care vor avea ca indicatie terapeutica interventia chirurgicala, recoltandu-se atat tesut tumoral, cat si tesut peritumoral, aparent indemn.

Daca nu se prelucreaza imediat pentru extractie de acizi nucleici (ADN / ARN), probele sunt conservate la -86°C.

Pentru fiecare caz in parte vor fi colectate, analizate sin sintetizate toate datele clinice si de laborator (biochimie, hematologie, anatomie patologice) precum si de raspuns la tratament si de evolutie a bolnavului.

Toate cazurile investigate vor respecta normele de etica in vigoare; astfel, probele vor fi recoltate numai cu consintamantului pacientului, care va fi informat asupra scopului studiului, ca si de pastrarea a confidentialitatii asupra rezultatelor obtinute.

Pentru animale, la care studiile vor viza numai cancerul mamar, conditiile vor fi mai putin restrictive, fiind incluse cazurile care vor fi operate in cazul clinicii de specialitate a partenerului 2 (USAMV Bucuresti), recoltandu-se, de asemenea, atat tesut tumoral, cat si peritumoral. Ca si la om, vor fi respectate normele de etica, probele fiind recoltate cu acordul proprietarilor.

In perioada care s-a scurs la la inceperea realizarii proiectului, a inceput, conform criteriilor mentionate, colectarea de probe, atat la om, cat si la animale de companie. Parte din aceste probe au fost deja prelucrate, primele rezultate obtinute - referitoare la gena ras, fiind prezentate in continuare.

Analiza mutatiilor genei KRAS in tumori colorectale

Materiale si metode

Au fost analizate probe biologice prelevate de la pacienti diagnosticati cu tumori primare colorectale, tratati chirurgical in Institutul Oncologic Bucuresti. Determinarile au inclus si linii celulare tumorale umane de colon (LoVo, Colo201, HT29 si SW1116) si rect (SW837).

Pentru screeningul mutatiilor in gena KRAS (exonii 1, 2 si 3) s-a utilizat metoda HRMA. Amplificarea s-a realizat intr-un volum final de 10 µl continand: 30 ng DNA, 5 µl de 2 x LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix (Roche Applied Biosciences), 3,0 mM MgCl₂ si cate 0,25 µM primeri sens si antisens. Amplificarea s-a realizat cu ajutorul aparatului

LightCycler 480 (Roche Applied Biosciences), in placi cu 96 de godeuri, controale negative si controale fara ADN (NTC) fiind incarcate in fiecare placa. In amplificare s-au folosit primerii interni descriși de Fadhil si colab [1]. Acelasi program touchdown PCR si aceleasi conditii de denaturare au fost utilizate pentru toti ampliconii. Amplificarea a constat dintr-o etapa de denaturare initiala de 10 min la 95°C, urmata de 45 de cicluri (95°C pentru 10 sec; 66-55°C (1°C /ciclu) pentru 30 sec si 72°C pentru 30 sec). Pentru denaturare a fost utilizat urmatorul program: 95°C pentru 1 min; 40°C pentru 1 min; topire de la 60-95°C (25 achizitii/°C); si 40°C pentru 1 min. Colectarea si analiza datelor s-au realizat cu ajutorul programului Gene Scanning.

Liniile celulare LoVo (pG13D) si SW1116 (pG12A) au constituit controale pentru mutatiile in exonul 12 al genei KRAS.

Metoda RFLP-PCR cu imbogatirea fractiei mutate (enrichment restriction fragment length polymorphism) a fost utilizata pentru a confirma prezenta mutatiilor in codonii 12 si 13 ai genei KRAS. Protocolul de lucru a fost modificat dupa cel prezentat de Nagasake si colab [2].

Pentru a analiza mutatiile in codonii 12 si 13 ai genei KRAS s-au utilizat primerii K12&13-F si Kwt-R creati pentru a introduce un situs de restrictie MvaI (New England Biolabs) in codonul 12 si un situs BglII (New England Biolabs) in codonul 13 al alelor normale.

Pentru exonul 12, amestecul de reactie in volum final de 25 µl a cuprins: 1 x tampon PCR, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, cate 0,1 µM primeri sens si antisens, 0,75 U AmpliTaq Gold DNA Polimeraza (Applied Biosystems). Prima runda de amplificare a avut urmatorul profil: 95°C, pentru 11 min, urmat de 30 cicluri (95°C pentru 30 sec, 55°C pentru 30 sec, 72°C pentru 30 sec) si o extensie finala de 5 min la 72°C.

Pentru exonul 13, conditiile de reactie au fost identice cu cele folosite pentru exonul 12 cu exceptia protocolului de amplificare in care temperatura de legare a primerilor a fost de 60°C. Cate 5 µl din produsii de amplificare au fost incubati cu 10 U MvaI, respectiv 10 U BglII, 3 ore, la 37°C. Cate 1 µl din produsii de digestie au fost utilizati in a doua runda de amplificare, intr-un volum final de 25 µl. Pentru codonul 12 s-au utilizat primerii K12&13F si 12mt-R pastrandu-se conditiile din prima amplificare. Primerii K12&13F si 13mt-R au servit la amplificarea codonului 13, in 25 de cicluri cu o temperatura de legare a primerilor de 62°C.

Produsii din a doua amplificare au fost incubati peste noapte, la 37°C cu MvaI (pentru codonul 12) sau BglII (pentru codonul 13). In urma digestiei produsii au fost vizualizati in gel de agaroză 4% cu bromura de etidiu. Cea de-a doua digestie cu MvaI a generat o banda de 98 pb si o banda de 69 pb ce corespund codonului 12 mutat, respectiv normal. Fragmentele generate prin digestie cu BglII au fost de 74 pb pentru codonul 13 normal si de 106 pb in cazul in care codonul era mutat.

Rezultate

Din totalul probelor cu mutatii in gena KRAS, cele mai frecvente au fost localizate in exonul 1, si mult mai rare in exonul 2 sau in exonul 3 (**fig.1**). Nu s-a constatat prezenta concomitenta a mai multor tipuri de mutatii ale genei KRAS, in probele analizate.

In paralel cu probele tumorale prelevate de la pacientii cu cancer colorectal au fost analizate 5 linii celulare tumorale de colon si rect. Liniile celulare LoVo, SW837 si SW1116 au exonul 1 mutat, in timp ce Colo201 si HT29 prezinta gena normala. Nici una dintre liniile celulare testate nu a prezentat mutatii in exonii 2 si 3.

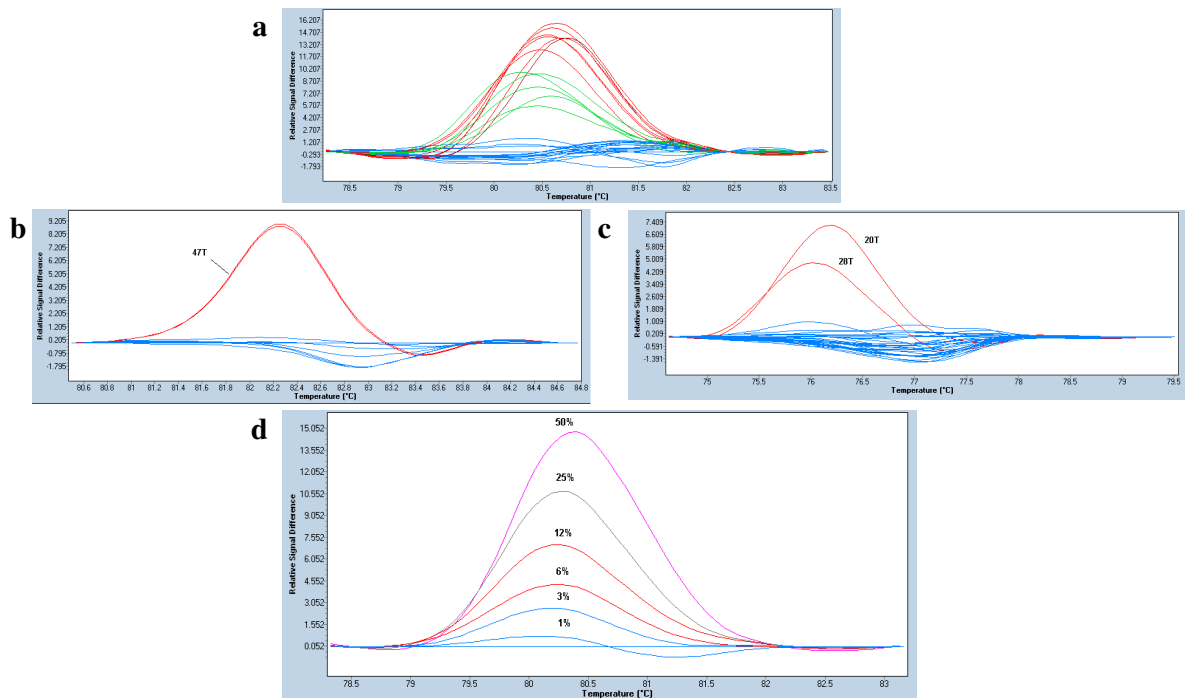


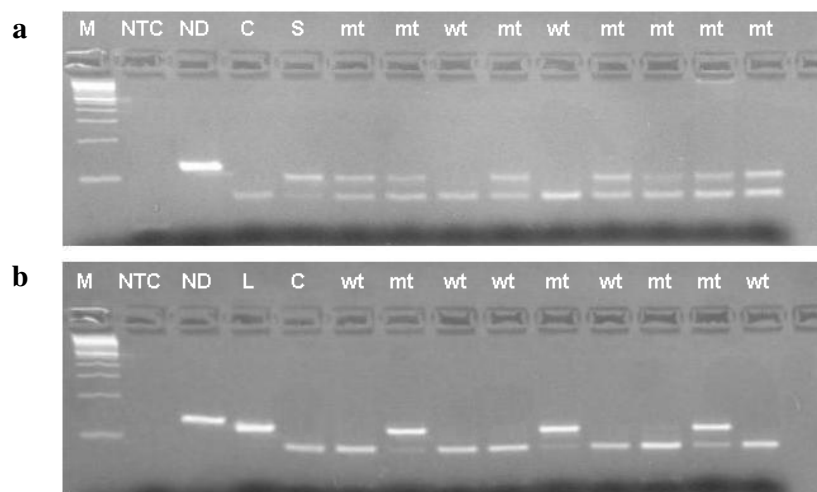
Figura 1. Detectia mutatiilor in gena KRAS prin HRM (a) exonul 1, (b) exonul 2, (c) exonul si curbele de disociere obtinute in testul de sensibilitate a HRM pentru detectia mutatiilor in exonul 1a1 genei KRAS (d)

Pentru a testa sensibilitatea metodei HRM, s-au realizat dilutiile succesive in raport de 1:2 din ADN extras din linia celulara LoVo cu ADN extras din linia celulara Colo201. Dupa amplificarea probelor si denaturarea produsilor de amplificare curbele de disociere au fost analizate (**fig. 1d**). Rezultatele demonstreaza ca limita de detectie a mutatiilor in exonul 1 al genei KRAS este de 3% celule tumorale mutate intr-un amestec heterogen.

Datele obtinute prin HRM indica prezenta a doua categorii de ampliconi cu temperaturi diferite de denaturare fapt care sugereaza existenta a doua locusuri diferite afectate de mutatii la nivelul exonului 1 al genei KRAS.

Discriminarea mutatiilor in exonul 1 s-a realizat utilizand metoda PCR-RFLP (**fig. 2**). Prin PCR-RFLP, toate mutatiile detectate prin HRM in exonul 1 al genei KRAS au fost confirmate.

Din probele cu mutatii in exonul 1, s-au decelat mutatii atat in codonul 12, cat si in codonul 13.



Detectia mutatiilor in codonii 12 (a) si 13 (b) ai genei KRAS in tumori colorectale. M – marker molecular; NTC – control fara ADN; ND – ADN nedigerat; C – Colo201; S – SW1116; L – LoVo; mt – mutat; wt – normal

1. Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, Ilyas M: *Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue*, J Clin Pathol, **63**(2),134-140,2010.
2. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, Kambara T, MacPhee DG, Young J, Leggett BA, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N: *Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation*, J Clin Oncol, **22**,4584-4594,2004.

Actualizarea conceptelor și tehnologiilor de fabricație pentru structuri de tip array și conceperea de sonde specifice pentru structuri de tip array pentru cancerul de sân

Dezvoltarea infrastructurii

Conform Planului de realizare și documentelor conexe – deviz 2012, pentru faza 1/2012 era prevăzută o sumă de 150.000 lei pentru achiziția de echipamente pentru cercetare, de către coordonatorul de proiect – Institutul Oncologic București.

Prin respectarea procedurilor legale în vigoare, s-a achiziționat un echipament “Aparat pentru mutații genice”, în valoare totală de 495.996,73 lei din care din bugetul proiectului, s-a utilizat o sumă de 150.000 lei – egală cu valoarea prevăzută inițial, diferența fiind acoperită din alte surse proprii ale coordonatorului. Aparatul a fost recepționat, urmând a fi utilizat pentru studii de secvențiere a genelor de interes care fac obiectul contractului (*brca1*, *brca2* și *ras*).

Atât coordonatorul de proiect, cât și ceilalți doi parteneri au achiziționat materiale consumabile, în special reactivi, necesari pentru studii, lista detaliată a acestora fiind prezentată în Fișa de evidență a cheltuielilor.

Diseminarea rezultatelor

Pentru prima etapă, Planul de realizare prevedea prezentarea a două comunicări științifice, obiective ce au fost depășite. S-a participat la mai multe manifestări științifice, cele mai importante, de nivel național și cu participare internațională fiind:

Congresul Național de Oncologie Medicală și Radioterapie, Sinaia, 18-20 oct.2012, la care s-au prezentat următoarele lucrări:

Efectele suprarenalectomiei chimice induse cu aminoglutetimidă la sobolani purtători de colangiocarcinom transplantabil (hepatom RS-1); autori: Valentina Negoita, Maria-Iuliana Gruia, Monica Vasilescu, Marieta Panait, Anca Sasareanu, Veronica Lazar, Gabriela Alecsa;

Carcinomul mamar spontan canin – model de studiu pentru cancerul de sân la om; autor: Marieta Panait;

Aspecte de citomorfologie limfonodala ale starilor limfoproliferative nespecifice; autor: Ana-Maria Coman;

Factori genetici implicați în cancer la om și animale; autor: Antonela Busca;

Expresia și cuantificarea AgNOR – potențial marker de prognostic în proliferarea celulară; autori: Daniela Fratila, Ana-Maria Coman, Sabin Cinca, Maria-Iuliana Gruia, Nicolae Manolescu;

Rolul micromediului tumoral în procesul de creștere tumorală și metastazare; autori: Cristina Nitu, Maria-Iuliana Gruia;

Analiza mamografică asistată software: tehnica și rezultate; autor: Iolanda Dumitrescu;

Metilarea insulelor CpG și alterările genetice în cancerul colorectal; autori: Liliana Puiu, Daniela Murarasu, Corina-Elena Mihalcea, Lorelei-Irina Brasoveanu, Eugen Bratucu, Marian-Augustin Marinacas, Sabin Cinca;

Expresia genelor asociate cu proliferarea celulara in tumorile colorectale; autori: Daniela Murarasu, Corina-Elena Mihalcea, Sabin Cinca, Lorelei-Irina Brasoveanu, Eugen Bratucu, Marian-Augustin Marinacas, Liliana Puiu;

Interrelatii intre teleomeraza, VEGF si Bcl-2 la pacienti cu radioterapie; autori: Maria-Monica Nistoroiu, Eliescu Ruxandra, Marieta Panait, Ileana Ionescu, Irina Isacu, Sabin Cinca;

Cardiotoxicitatea indusa de inhibitorii de Her-2 – aspecte moleculare; autor: Mirela Dumitru;

Determinarea expresiei proteice a ADN-topoizomerazelor la nivelul tumorilor murine si umane; autori: Maria-Monica Vasilescu, Maria-Iuliana Gruia, Marieta Panait, Angelica Cordas, Lorelei-Irina Brasoveanu;

Rolul metaloproteinazelor in agiogeneza, progresia si metastazarea tumorală; autori: Daniela Glavan, Maria-Iuliana Gruia;

Reconstructia, redarea si evaluarea asistata software a volumului tumoral in timpul tratamentului; autor: Iolanda Dumitrescu;

Efectul iradierii terapeutice cu I-131 asupra remodelarii matriceale extracelulare in cancerul tiroidian papilar cuffara boala Graves; autori: Adina-Elena Stanciu, Anca Hurduc, Anca Sasareanu, Anca Zamfirescu, Paul Albert, Tinca Tegus, Marcela Vaduva, Claudia Nicorovici, Daniela Dragomir;

Management de proiect. Organizarea echipelor de coordonare ale proiectului (administrativă, științifică și economică) și a sit-ului proiectului.

Obiectivul a fost realizat:

au fost nominalizati membrii celor trei echipe de coordonare, formate din cercetatori din cele trei institute partenere; echipele de coordonare economica cuprind si economisti. Directorul de proiect a realizat cooperarea intre membrii echipelor si a urmarit realizarea obiectivelor de etapa. a fost realizat sit-ul de prezentare a proiectului: www.iob/cercetare/proiecte_natioanle.