

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul IV – BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE

NITUȘCĂ DIANA-GABRIELA



TEZĂ DE DOCTORAT

**Valoarea diagnostica a speciilor de arn non-codant și a
metabolitilor plasmatici in adenocarcinomul de prostata**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MARIAN CĂTĂLIN

Timișoara

2024

REZUMAT

În ultimul deceniu, a fost observată o incidență în creștere a cancerului de prostată (cazurile de cancer de prostată au crescut cu 3% pe an din 2014 până în 2019, cu o rată de incidență mai mare în rândul bărbaților afro-americieni în comparație cu bărbații caucazieni), reprezentând în 2024 a 2-a cea mai comună formă de cancer în rândul bărbaților din întreaga lume. În plus, acest tip de cancer are o rată de incidență de aproape 60% la bărbații peste 65 de ani, care, datorită vârstei înaintate, sunt imunologic mai susceptibili la dezvoltarea unor complicații care vor duce la creșterea mortalității și a morbidității asociate acestui tip de cancer.

Incidența crescută a acestei patologii urologice poate fi explicată, pe de o parte, datorită caracterului ei asimptomatic sau nespecific în stadiile precoce de dezvoltare, ceea ce duce la un diagnostic tardiv în majoritatea cazurilor, iar pe de altă parte datorită lipsei biomarkerilor de diagnostic suficient de specifici, sensibili și accesibili din punct de vedere economic. Cel mai frecvent marker molecular folosit în practica clinică curentă pentru diagnosticul și monitorizarea cancerului de prostată este antigenul specific prostatic (PSA, ng/ml), iar utilitatea acestuia a fost în centrul controverselor și dezbaterilor în comunitatea științifică în ultimul deceniu, datorită faptului că posedă o sensibilitate crescută și o specificitate scăzută (PSA poate avea valori crescute și în alte patologii non-maligne asociate prostatei, precum inflamație, creștere în greutate etc.) și efectul minim asupra mortalității cauzate de cancerul de prostată, fapt care a dus la supradiagnostic, administrarea de tratamente excesive și efectuarea de biopsii invazive care nu au fost necesare. Prin urmare, sunt necesare cercetări suplimentare pentru descoperirea, dezvoltarea și validarea unor biomarkeri de diagnostic noi, minim invazivi, care ar putea completa pe cei existenți pentru detectarea și monitorizarea cancerului de prostată, sau care ar putea chiar depăși performanța markerilor actuali.

Prin urmare, având în vedere motivația, importanța și actualitatea temei de doctorat alese, obiectivele acestui studiu au fost:

O1. Determinarea profilurilor plasmatice de ARN lung non-codant (lncRNA) aparținând unui grup de 30 de subiecți, dintre care 15 aparțin grupului de pacienți cu cancer de prostată confirmat cu diferite niveluri de PSA și scoruri Gleason, iar 15 aparțin grupului de subiecți sănătoși. Obiectivul acestei etape este de a demonstra capacitatea lncRNA de a distinge între aceste două grupuri, prin expresie diferențială, ceea ce va sugera rolul lor ca biomarkeri de diagnostic în cancerul de prostată. Această analiză se realizează practic prin tehnici de reacție de polimerizare în lanț (qPCR) în timp real, după extracția ARN total cu ajutorul unor kituri specifice achiziționate de la producători consacrați. În plus, pentru comparație, în cadrul obiectivului O1, profilurile lncARN sunt determinate din biopsii disponibile de la 8 subiecți (4 pacienți și 4 martori) prin tehnica microarray.

O2. Identificarea lncRNA-urilor relevante, comune, exprimate diferențial în cele două tipuri de probe biologice (plasmă și țesut), prin compararea datelor obținute din cele două analize distincte efectuate (qPCR și microarray).

O3. Etapa de validare: determinarea nivelului de expresie al lncRNA comun identificat din panelul selectat la O1, într-un studiu caz-control al cancerului de prostată, cuprinzând cele 15 cazuri anterioare și 15 controli, plus 37 de pacienți și 23 de controli suplimentari, pentru replicarea și validarea lncRNA-urilor specifici ca biomarkeri de diagnostic a cancerului de prostată. În cadrul acestui obiectiv, analiza se realizează prin qPCR utilizând primeri specifici pentru lncRNA identificat la O2, iar diferența semnificativă statistic între nivelul de expresie a lncRNA din probele pacientului față de controli va fi exprimată prin valoarea statistică a lui p, care trebuie să fie mai mic de 0,05 pentru a fi considerat semnificativ statistic. Datele sunt, de asemenea, comparate cu literatura științifică relevantă și actuală. Nu în ultimul rând, valoarea diagnostică a lncRNA respectiv este evaluată prin analiza statistică a caracteristicilor de funcționare a receptorului (ROC) și prin valoarea ariei sub curbă (AUC).

O4. Separarea și identificarea tuturor metaboliților circulanți (< 550 Da) prin tehnici moderne de cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (UHPLC-QTOF-(ESI+)-MS) din probe de plasmă de la

pacienți cu cancer de prostată confirmat histopatologic și indivizi sănătoși (71 de probe în total – 48 de pacienți și 23 de controli, la fel de la obiectivele anterioare plus alte probe suplimentare primite pe parcurs de la Secția de Urologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara).

O5. Compararea și analiza metaboliților exprimați diferențial în probele de cancer de prostată comparativ cu martorii; analiza statistică multivariată pentru discriminarea și separarea grupurilor; analiza statistică univariată pentru evaluarea performanței de diagnostic a metaboliților exprimați diferențial; analiză metabolomică non-țintită (cu identificarea tuturor moleculelor prin consultarea bazelor de date stabilite) și țintită care a fost efectuată prin selectarea celor mai relevanți și mai studiați metaboliți, descoperiți în faza nețintită (și coroborate cu literatura disponibilă la nivel internațional până în 2023): spermină, acetilcarnitină, triptofan, prolină, lizofosfatidilcolină C18:2.

O6. Corelarea metaboliților cu diferite concentrații, semnificative statistic ($p < 0,05$), cu nivelul seric de PSA și cu stadiul cancerului pentru evaluarea potențialului de prognostic și de stadializare.

O7. Realizarea unei meta-analize (in silico) pentru a evalua valoarea diagnostică a unui microARN studiat intens în literatură (miR-375) ca potențial biomarker de diagnostic în cancerul de prostată. Pentru atingerea acestui obiectiv se studiază literatura de specialitate pentru identificarea celor mai relevante microARN asociate cu acest tip de cancer și care în prezent nu beneficiază de un studiu global de acest fel, iar apoi, pentru microARN ales, se efectuează testele statistice necesare: evaluarea valorii acestuia ca potențial biomarker de diagnostic, prin reunirea tuturor rezultatelor statistice obținute individual de cercetători internaționali care au studiat același microARN și care au îndeplinit criteriile de includere.

În studiul 1, în urma comparației dintre țesuturile FFPE și probele de plasmă, am observat un singur lncARN comun, exprimat semnificativ diferențial, cu expresie crescută în cancer, și anume lncRNA NEAT1 ($p < 0,05$ în ambele grupuri de analiză). În pasul următor, NEAT1 a fost validat individual în probe de plasmă și țesut din ambele grupuri, deoarece expresia sa a fost în mod obișnuit și semnificativ crescută în cancer.

În probele de plasmă din grupul 1 (denumit TM), deși NEAT1 a avut o expresie aproape de două ori mai mare ($FC = 1,836$), din păcate, pragul de semnificație statistică nu a fost atins ($p = 0,351$), probabil din cauza cohorței limitate. În schimb, în grupul 2 (numit CJ), unde dimensiunea eșantionului a fost mai mare, NEAT1 a crescut semnificativ în cancer ($FC = 2,101$, $p = 0,009$).

Analiza ROC pentru NEAT1 din Grupul 2 (CJ) a relevat o valoare foarte bună a ariei de sub curbă (AUC) de 0,7298 (95% CI = 0,5812–0,8785), sugerând, prin urmare, un potențial biomarker ridicat pentru acest tip de lncRNA.

În studiul 2, din cele șase articole incluse în meta-analiză, am identificat un total de 422 de pacienți cu cancer de prostată diagnosticat și 212 controli (70 de subiecți sănătoși și 142 de pacienți cu HBP). Dintre toate studiile incluse, trei au folosit ser, două au folosit plasmă și două au folosit urină ca probe biologice. QUADAS-2 a arătat că marea majoritate a studiilor de cercetare incluse au avut un risc scăzut de părtinire.

Deoarece după testarea eterogenității între studii am găsit eterogenitate semnificativă ($I^2 = 93,68\%$ și, respectiv, $86,12\%$ pentru sensibilitate și, respectiv, specificitate), am decis să folosim modelul cu efecte aleatoare. Meta-analiza a arătat o sensibilitate combinată de 0,76 (95% CI: 0,55–0,89) și o specificitate combinată de 0,83 (95% CI: 0,63–0,94) și o valoare ASC de 0,87 (95% CI: 0,83–0,89), indicând o acuratețe generală bună de diagnosticare pentru miR-375.

Pe baza estimărilor cumulate calculate ale sensibilității și specificității, am calculat raporturile de probabilitate medii ale rezultatelor testelor pozitive și negative și am constatat că LR+ și LR- pentru miR-375 au fost 4,6 (95% CI: 2,30–9,30) și 0,29. (95% CI: 0,16–0,51). În plus, am obținut o valoare medie DOR de 16 (95% CI: 10–26).

Apoi, am investigat posibile surse de eterogenitate atât în sensibilitate, cât și în specificitate, efectuând o analiză de metaregresie bazată pe tipul de specimen biologic utilizat și am constatat că tipurile de probe biologice folosite ar putea reprezenta o potențială sursă de eterogenitate în specificitate ($p < 0,001$). Cu toate acestea, având în vedere designul la scală mică a studiului, sunt necesare rapoarte suplimentare pentru a elucida pe deplin sursa eterogenității.

Analiza probabilităților pretest și posttest sugerează o valoare de diagnostic oarecum ridicată a miR-375 ca viitor biomarker promițător pentru această boală urologică. La o probabilitate pretest de 25%, pozitivitatea probabilității posttest ar crește la 60% cu un LR+ de 5, în timp ce negativitatea probabilității posttest ar scădea la 9% cu un LR- de 0,29.

În cele din urmă, am efectuat analizele de sensibilitate și specificitate cumulate după eliminarea fiecărui raport și am constatat că rezultatele finale nu diferă mult de rezultatele inițiale. Corelate cu lipsa de semnificație a lui Deeks pentru testul de asimetrie ($p = 0,58$), aceste date sugerează cu tărie o lipsă de părtinire semnificativă de publicare a rapoartelor și subliniază stabilitatea și credibilitatea rezultatelor.

În studiul 3, au fost identificate un total de 296 de molecule cu greutate moleculară sub 550 Da. Aceste molecule au fost ulterior identificate folosind diferite baze de date internaționale, cum ar fi Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>), Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) și baza de date Heidelberg (<https://www.msomics.com/>).

Marea majoritate a metaboliților identificați au fost fie aminoacizi (AA - cum ar fi prolină, triptofan, valină, treonină, acid aspartic, ornitină, lizină, acid glutamic etc.), fie au fost produși derivați din metabolismul AA. Alți metaboliți identificați au fost de tip aminic (spermină, glutamină, serotonină) sau, în general, compuși cu conținut ridicat de azot, în timp ce o parte substanțială constau din metaboliți derivați din metabolismul lipidic (fosfolipide, lizofosfolipide, acizi grași). O mică parte au fost metaboliți nucleotidici, cum ar fi uridina, guanozina și inozina. Interesant, aceste date preliminare sunt în concordanță cu alte constatări din literatura de specialitate cu privire la profilurile lipidice și AA liberi.

Apoi, am efectuat o analiză ROC pentru a evalua potențialul de biomarker, cu calculul corespunzător al ariei sub curbă (AUC), iar metaboliții au fost clasificați pe baza valorilor AUC. Cele mai reprezentative molecule pentru a discrimina grupul C de grupul P și pentru a fi considerați biomarkeri potențiali (cu valori AUC mai mari de 0,7) sunt AA (cum ar fi L-triptofan, tirozină, prolina și derivații acestora), fosfatidilcoline, amine (spermină), N1-acetilspermidină, L-cistationină, D-sfingozină, hexacosanoilcarnitină și unii acizi grași și esteri. AA acilați (acetiltirozină) au fost, de asemenea, importanți pentru discriminare.

În plus, conform analizei anterioare neținute și în concordanță cu alte constatări din literatură, am selectat cinci molecule diferite (prolină, spermină, acetilcarnitină, L-triptofan și LPC 18:2 lizofosfatidilcolină) pentru studiul metabolomic ținut.

Am determinat și calculat astfel curbele și ecuațiile de calibrare (inclusiv valorile R^2), precum și limitele de detecție (LOD) și limitele de cuantificare (LOQ) ale fiecărui standard. Coeficienții de corelație (R^2) au fost mai mari de 0,898 pentru toate standardele din domeniul lor liniar, arătând relații liniare bune în intervalele liniare. Toate valorile LOD au fost în intervalul 0,3-4 μM , iar valorile LOQ au fost în intervalul 0,9-5,5 μM .

De asemenea, au fost realizate grafice pentru curbele de calibrare, din care au fost generate ecuațiile dreptelor de etalonare și valorile R^2 , pentru fiecare metabolit selectat separat.

Se observă că toți metaboliții au avut niveluri scăzute în grupul P, indiferent de stadiul lor, comparativ cu grupul C. Pentru L-prolină, am observat o scădere treptată a concentrației de la stadiul I la stadiul III, după care o creștere ușoară în stadiul IV. În plus, nivelurile de spermină au scăzut de peste 10 ori în grupul P (toate etapele) comparativ cu grupul C, cu cea mai semnificativă schimbare dintre toți metaboliții. Pentru acetilcarnitină, a existat o creștere treptată a concentrațiilor care a fost direct proporțională cu etapele II-IV, în timp ce invers a avut loc pentru L-triptofan (stadiile I-III), care a avut un profil similar cu L-prolina.

În plus, pentru a evalua potențialul de stadializare al acestor cinci molecule, au fost efectuate teste ANOVA unidirecționale obișnuite pe valorile lor de concentrație (μM) pentru control și pacienți grupați în funcție de stadiul AJCC al

acestora (I, II, III și IV). S-au observat diferențe semnificative statistic pentru spermină, acetilcarnitină și L-triptofan ($p < 0,0001$), dar nu pentru L-prolină ($p = 0,209$) sau LPC 18:2 ($p = 0,159$).

Testele t nepereche au arătat că au existat diferențe semnificative statistic între pacienți (toate etapele) și martori pentru toate cele cinci molecule analizate. Spermina, acetilcarnitina și L-triptofanul au prezentat valori p sub 0,0001, în timp ce L-prolina și LPC 18:2 au avut valori p de 0,02 și, respectiv, 0,01. Toate cele cinci molecule au avut concentrații semnificativ mai mici în grupul de pacienți, comparativ cu grupul de control.

Conform datelor obținute, molecula cu cel mai mare potențial de diagnostic este reprezentată de L-triptofan (valoarea AUC de 0,981), sugerând un potențial de diagnostic foarte bun pentru depistarea cancerului de prostată. Același lucru este valabil și pentru acetilcarnitină și spermină (valori AUC de 0,923 și, respectiv, 0,922), în timp ce L-prolina și LPC 18:2 au prezentat doar o valoare diagnostică moderată, ambele cu valori AUC sub 0,7.

În concluzie, această teză de doctorat demonstrează că cercetarea, într-o manieră pluridisciplinară (folosind diverse tehnici și ținând molecule din diverse clase biochimice) a unor noi biomarkeri pentru depistarea precoce și specifică a cancerului de prostată (cu o incidență în creștere), reprezintă un pas înainte pentru medicina modernă, minim invazivă, personalizată, bazată pe dovezi solide, care ar putea reprezenta un real avantaj atât pentru specialiști cât și pentru confortul pacientului. Se pare că biopsia lichidă are un potențial enorm de elucidare a proceselor de carcinogeneză care au loc la nivel celular. Investigarea diferiților metaboliți sau material genetic din fluidele biologice circulante, care provin din fluxul circulator direct din locurile tumorale, ar putea ajuta la o înțelegere mai profundă a mecanismelor cancerului și ar putea reprezenta, de asemenea, noi biomarkeri de încredere pentru diagnosticul precoce și specific al acestei malignități.

Astfel, am demonstrat (prin studiul 1) că specia lncRNA NEAT1 este supraexprimată statistic semnificativ în probele biologice de la pacienții cu cancer de prostată confirmat, în comparație cu martorii sănătoși, și că valoarea diagnostică este foarte mare, sugerând potențialul NEAT1 ca biomarker pentru depistarea acestei patologii.

De asemenea, meta-analiza efectuată (în studiul 2), a coroborat datele existente în literatură și a confirmat statistic că miR-375 are o acuratețe diagnostică satisfăcătoare în diferențierea cancerului de prostată de indivizii sănătoși.

Nu în ultimul rând și fără a mă limita la studiul materialului genetic necodant, am demonstrat (prin studiul 3) că metabolomica reprezintă o tehnică emergentă pentru descoperirea simultană a metaboliților circulanți cu niveluri semnificativ modificate în cancerul de prostată. În acest sens, am observat o scădere a diferitelor clase de molecule precum aminoacizi (triptofan, prolină), amine (spermină), lizofosfatidilcolină și acetilcarnitină, în probele bolnavilor de cancer comparativ cu indivizii sănătoși.

Prin urmare, acest studiu arată că diferiții biomarkeri moleculari, împreună cu caracteristicile clinice și histopatologice ale tumorilor și tehnicile imagistice vor trebui coroborate și utilizate într-o manieră complementară, mai degrabă decât competitivă, deoarece fiecare prezintă particularități specifice și oferă informații cruciale pentru un diagnostic precoce și eficient, care ar putea duce nu numai la scăderea incidenței cancerului de prostată, ci și la o creștere a calității vieții acestor pacienți, ceea ce va duce la reducerea morbidității și mortalității cauzate de cancerul de prostată.