

REZUMAT

STUDII PRIVIND DETECȚIA CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE DIN SÂNGE ÎN CARCINOMUL MAMAR LA CÂINE (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*)

Doctorand: BURINARU Tiberiu Alecu

Conducător științific: Prof. univ. Dr. Militaru Manuela

CUVINTE CHEIE: Celule tumorale circulante, carcinom mamar canin, dispozitiv microfluidic, senzor electrochimic, spectroscopie electrochimică de impedanță.

Tumorile mamare la canini reprezintă o problemă majoră de sănătate fiind tumorile cel mai des diagnosticate la femele, 50-80% din acestea fiind maligne. Cercetarea în domeniul oncologiei veterinare este în creștere, concentrându-se pe dezvoltarea de noi tehnici de diagnosticare precoce și descoperirea de noi biomarkeri care pot fi utilizați pentru a detecta tumorile sau pentru a evalua prognosticul și eficiența tratamentului.

Cercetările cuprinse în acest studiu s-au realizat în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, și au cuprins investigații antemortem efectuate pe femele canine, cât și studii realizate pe linii celulare tumorale. Tot în cadrul Facultății de Medicină Veterinară s-a realizat și examenul PCR. Examenul imunofluorescent s-a realizat în cadrul Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”. Testele pe linii celulare s-au realizat în cadrul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare „Victor Babeș” București. Proiectarea și fabricarea dispozitivului microfluidic s-a realizat în cadrul Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Microtehnologie - IMT București.

Structura tezei. Teza de doctorat „*Studii privind detecția celulelor tumorale circulante din sânge în carcinomul mamar la câine (canis lupus familiaris)*” este structurată conform prevederilor legale în două părți principale. *Partea I: Studiu bibliografic* cuprinde 34 de pagini, reprezentând 27,6% din lucrare. Această parte este structurată în patru capitole și prezintă anatomia, histologia și fiziologia glandei mamare la cățea, procesul tumoral și metastazarea tumorilor glandei mamare și detecția și implicațiile clinice ale celulelor tumorale circulante. *Partea a II-a: Cercetări proprii* este structurată în cinci capitole și cuprinde scopul și obiectivele cercetărilor, materialul de studii și metodele utilizate pentru diagnostic, pentru dezvoltarea sistemului microfluidic și pentru testarea acestuia, evaluarea prezenței moleculelor EpCAM și

CRYAB în carcinomul mamar, descrierea fluxului tehnologic pentru crearea dispozitivului microfluidic, experimente de testare a dispozitivului pe linii celulare tumorale și experimente de testare a dispozitivului pe probe de la pacienți. Acestă parte cuprinde 89 de pagini, reprezentând 72,4% din lucrare.

Partea I: Studiu bibliografic

Capitolul I - Anatomia, histologia și fiziologia glandei mamare la cățea oferă informații despre aspectul, morfologia și fiziologia normală a glandei mamare la cățea. Aceste informații sunt imperios necesare pentru a putea observa și distinge modificările patologice care apar odată cu dezvoltarea unei tumori la acest nivel.

Capitolul II - Procesul tumoral mamar conține atât generalități despre procesul tumoral cât și descrie mecanismele de carcinogeneză. Capitolul prezintă clasificarea tipurilor de tumori mamare și descrierea histologică a tumorilor mamare maligne de origine epitelială. Totodată, sunt prezentate informații despre frecvența, stadializarea și prognosticul tumorilor mamare la câine.

Capitolul III - Metastazarea tumorilor glandei mamare la femele prezintă atât generalități legate de procesul de metastazare, cât și patogeneza metastazării. Întrucât teza de față propune detecția celulelor tumorale circulante, acest capitol este deosebit de important pentru înțelegerea modului în care celulele tumorale ajung în fluxul sanguin.

Capitolul IV - Celulele tumorale circulante, detecție și implicații clinice oferă informații despre caracteristicile generale ale celulelor tumorale circulante și date despre stadiul actual al utilizării celulelor tumorale circulante în medicina veterinară. Capitolul prezintă markeri utilizați pentru detecția celulelor tumorale circulante la câine și dispozitive și metode de detecție a CTC-urilor în medicina umană și veterinară. Ultima secțiune a capitolului prezintă implicațiile clinice în medicina umană și veterinară.

Partea a II-a: Cercetări proprii

Capitolul V - Materiale și metode generale utilizate pentru detecția celulelor tumorale circulante cuprinde informații despre animalele luate în studiu, metodele de stabilire a diagnosticului, tehnici de biologie moleculară pentru depistarea unor molecule de pe suprafața celulelor cu rol de marker tumoral, linii celulare tumorale utilizate pentru testarea funcționalității dispozitivului și procesul tehnologic utilizat pentru fabricarea dispozitivului microfluidic.

Cercetările desfășurate în cadrul acestui studiu au avut loc în perioada 2016-2023, pe un număr de 12 câini de la care s-au recoltat 9 probe de țesut tumoral și 3 probe de sânge. Activitățile de cercetare au cuprins activități specifice de diagnostic și caracterizare a markerilor tumoral, activități de microfabricație a unui sistem microfluidic cu un senzor electrochimic integrat și activități de detecție a celulelor tumorale circulante din probe de sânge de la câini cu carcinom mamar.

Pentru a demonstra funcționalitatea senzorilor electrochimic dezvoltați în acest studiu s-au utilizat trei linii celulare tumorale: adenocarcinom de colon uman linia

celulară SW-403 (nr. de catalog 87071008), HT-29 (nr. de catalog 91072201) și celule de cancer de sân MCF-7 (HTB-22-ATCC). De asemenea dispozitivul a fost testat folosind 3 probe de sânge de la pacienți cu carcinom mamar.

Metodele utilizate pentru diagnostic și biologie moleculară au constatat în examenul citopatologic, examenul histopatologic, examenul imunofluorescen și examenul Reacției de Polimerizare în Lanț.

Metodele utilizate pentru dezvoltarea sistemului microfluidic și pentru detecția celulelor tumorale circulante au fost: microfabricarea, microscopia electronică de baleiaj (SEM), spectroscopia Raman, măsurători electrochimice, creșterea grafenei veticale, sinteza nanoparticulelor de aur, imobilizarea anticorpilor anti-EpCam și obținerea PDMS și încapsularea senzorului electrochimic.

Capitolul VI - Detecția moleculelor EpCAM și CRYAB în carcinomul mamar canin s-a studiat prezența markerului EpCAM și 7 markeri ARNm tumorali și anume CLDN7, CRYAB, ELF3, SLC1A1, ATP8B1, EGFR și F3 exprimați în tumori mamare canine cu diferite histotipuri. Au fost analizate probe de țesut proaspăt folosind două tehnici diferite pentru identificarea moleculelor de interes. Pentru a detecta EpCAM în probe de țesut proaspăt, am folosit metode de imunofluorescență după congelarea țesutului și tăierea lui cu un criotom. Pentru a detecta ARNm am folosit tehnica de detecție real-time PCR.

Molecula EpCAM a fost detectată în 5 probe de țesut tumoral proaspăt din aceeași masă tumorală care a fost folosită pentru stabilirea diagnosticului prin examenul histopatologic. S-au utilizat fragmente tumorale de 2 x 2 cm² care au fost încorporate în Tissue-Tek® O.C.T. Compus și congelat la -80°C. Examinarea imunofluorescenței a fost efectuată prin etalarea criosecțiunilor de 5 μm ale țesutului tumoral pe lame de sticlă folosind criotomul. S-a folosit o metoda indirectă de imunofluorescență utilizând ca anticorp primar anticorpi anti-EpCAM policlonal de iepure și ca anticorpi secundari fluorescenți anticorpi anti-iepure de capră.

Din cei șapte markeri pe care i-am propus pentru detecția cu ajutorul qPCR doar CRYAB a fost detectat în cele 9 probe analizate. Ciclu mediu de cuantificare (Cq) pentru probele în care a fost detectat markerul CRYAB a fost 11,93. Comparând acest număr cu media Cq a actinei B care a fost 20,92, putem extrapola că a existat o creștere a activității markerului ARNm CRYAB în probele tumorale. ARN-ul a fost extras din probe proaspete de țesut tumoral de 15 mg prin protocolul de „purificare a ARN total din țesutul animal” folosind kitul RNeasy Mini. Această metodă este utilizată pentru a îmbogăți ARNm, deoarece numai moleculele de ARN mai lungi de 200 de nucleotide sunt prinse în membrana de silicon a kit-ului, restul moleculelor de ARN precum 5.8SrRNA, 5S ARNr și ARNt-urile fiind mai mici sunt excluse selectiv. Volumul final al probei a fost de 50 μl. Detecția markerilor ARNm a fost realizată folosind metoda real time-PCR (qPCR).

A fost detectată prezența EpCAM în cinci țesuturi tumorale diferite de la câini cu diferite tipuri de carcinoame mamare folosind tehnici de imunofluorescență. De

asemenea, a fost detectată prezența CRYAB în nouă probe de țesut diferite de la câini cu diferite tipuri de carcinoame mamare folosind examenul PCR în timp real. Tipuri mai agresive de carcinoame mamare au exprimat valori mai mari ale EpCAM și CRYAB. CRYAB poate fi folosit ca marker pentru diagnosticul carcinoamelor mamare și pentru evaluarea agresivității tumorii.

Capitolul VII - Fabricarea senzorului electrochimic descrie procesele tehnologice prin care s-au obținut două tipuri de senzori electrochimici destinați pentru detecția celulelor tumorale circulante. Acești doi senzori au fost incapsulați individual într-un polimer numit polidimetilsiloxan (PDMS) pentru a obține dispozitive microfluidice capabile să analizeze probe de sânge în flux continuu pentru a evita pierderea probei sau contaminarea ei.

Dispozitivele au la bază o placchetă de siliciu de 4 inch pe care, prin transferul optic al geometriei de pe măști pe placeta de siliciu acoperită cu un substrat de fotorezist, au fost realizate o serie de 23 de senzori electrochimici cu electrozi din aur. Aceștia, prin adăugarea unor procese tehnologice suplimentare, au fost îmbunătățiți prin acoperirea electrozilor de lucru interdigitați cu un strat de grafenă verticală. Grafena verticală este un material nanocarbonic 3D de ultimă generație menit să îmbunătățească performanțele senzorului. Mai mult, grafena verticală a fost decorată cu nanoparticule de aur (AuNP) care au rolul de a mări suprafața grafenei, deci curentul și respectiv sensibilitatea senzorului, și rolul de a crește specificitatea detecției prin atașarea mai multor molecule de anticorpi pe aceeași suprafață de detecție.

Acest tip de senzor este un senzor de tip „In House” cu design și geometrie unice proiectat și dezvoltat în cadrul Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Microtehnologie - IMT București. Senzorul are o dimensiune de $25 \times 10 \text{ mm}^2$ și prezintă un electrod auxiliar, un electrod de referință și un electrod de lucru interdigitat cu 64 de perechi de interdigiti cu o lățime de $20 \text{ }\mu\text{m}$ și un interspațiu de $10 \text{ }\mu\text{m}$.

În cadrul acestui capitol a fost demonstrată și dezvoltarea unei noi metode de incapsulare a senzorilor electrochimici utilizând printarea 3D. Incapsularea senzorului în PDMS, transformă un simplu senzor într-un dispozitiv microfluidic complex care permite analiza în totalitate a unor probe de sânge într-un mod controlat minimizând pierderile și contaminările probelor.

Capitolul VIII - Biosenzor pe bază de grafenă verticală pentru evaluarea semnăturii dielectrice a celulelor tumorale descrie prima etapă de testare a senzorilor electrochimici. Din cauza faptului că heterogenitatea celulelor tumorale circulante este mare și numărul acestora într-o probă de sânge este necunoscut, pentru ca etapa de testare să fie relevantă din punct de vedere științific au fost utilizate probe cu concentrații cunoscute de celule tumorale din linii celulare tumorale standardizate și caracterizate din punct de vedere morfologic.

Proprietățile dielectrice ale celulelor tumorale au fost evaluate cu ajutorul unui biosenzor bazat pe EIS. Senzorul a fost testat folosind trei linii celulare tumorale diferite:

celule tumorale de cancer de sân uman (MCF-7), linia celulară de adenocarcinom colorectal SW-403 și linia celulară de adenocarcinom colorectal HT-29. Noutatea abordării constă în utilizarea unui biosenzor electrochimic cu grafenă verticală. Am demonstrat că, prin utilizarea senzorului dezvoltat, am putut face diferența între trei tipuri diferite de linii celulare tumorale pe baza semnăturii dielectrice specifice fiecărei linii celulare.

Biosenzorul a fost capabil să detecteze 100 de celule mL^{-1} . După analizarea datelor obținute, s-a ajuns la concluzia că celulele liniei celulare tumorale HT-29 au o suprafață membranară mult mai mare și o reactanță capacitivă mai mică în comparație cu celulele liniei celulare tumorale SW-403. Deoarece celulele HT-29 au o capacitate membranară mai mare, acestea stochează un număr mai mare de sarcini electrice, ceea ce duce la o conductivitate mai mare și la o rezistență mai mică la transferul de sarcină. Microviliile membranari posedă o concentrație foarte mare de resturi lipidice, în special colesterol-glicosfingolipide. Astfel, putem deduce că celulele HT-29 au mai multe punți lipidice decât celulele SW-403. Celulele tumorale SW-403 au tendința de a adera și de a forma grupuri mari de celule. Acest fapt este validat prin măsurători EIS folosind senzorul dezvoltat. MCF-7 sunt celule mari și aderente, cu o dimensiune de 20-25 μm . Rezultatele arată că acestea au o rezistență mai mică la transferul de sarcină și o conductivitate și o permitivitate mai mari decât celelalte două linii de celule tumorale studiate.

Capitolul IX - Detecția celulelor tumorale circulante în carcinomul mamar canin prezintă a doua etapă de testare a dispozitivului microfluidic atât cu probe cu concentrații cunoscute de celule tumorale provenite din linii celulare folosite ca model pentru detecția celulelor tumorale circulante cât și cu probe de sânge provenite de la pacienți cu carcinom mamar în care s-a încercat detecția și capturarea posibilelor celule tumorale circulante existente în fluxul sanguin.

Testele au fost efectuate folosind unul dintre senzorii dezvoltați în capitolul VII, un senzor EIS încapsulat în PDMS. Acesta constă într-un biosenzor cu electrozi de aur interdigitați funcționalizați cu anticorpi anti-EpCAM capabil să captureze și să analizeze proprietățile dielectrice ale CTC-urilor capturate. De asemenea, a fost evaluat și un nou marker metastatic cu ajutorul anticorpilor anti-CD36. Dispozitivul a fost testat folosind linia celulară tumorală de cancer de sân MCF-7 ca model de celule tumorale circulante. Dispozitivul a fost testat, de asemenea, folosind trei probe de sânge de la câini cu carcinom mamar. Sângele întreg a fost lizat pentru a elimina globulele roșii, iar probele rezultate au fost trecute prin dispozitivul microfluidic. Legarea CTC-urilor a fost evaluată pe baza modificării impedanței.

Am demonstrat sensibilitatea dispozitivului microfluidic prin detectarea a numai 3 celule MCF-7 pe suprafața electrodului. De asemenea, prin utilizarea dispozitivului am detectat CTC-uri în probe de sânge de la pacienți cu carcinom mamar. CTC-urile sunt cuantificate pe baza creșterii impedanței, care este direct proporțională cu numărul de

celule capturate. Diagrama Bode arată caracteristicile dielectrice ale CTC-urilor capturate.