

---

Rezumatul tezei doctorale

# **Influența factorilor nutriționali și a stilului de viață în cancerul colorectal**

---

Doctorand **Biriș Laura Ioana (Gavrilaș)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Corina Ionescu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Epidemiologia și etiologia cancerului colorectal</b>	19
1.1. Cancerul colorectal ereditar	20
1.2. Cancerul colorectal sporadic	21
1.2.1. Mecanisme implicate în carcinogeneză	21
1.2.1.1. Pierderea caracterului heterozigat	21
1.2.1.2. Instabilitatea microsatelitului	22
1.2.1.3. Hipermetilarea grupărilor CpG	22
1.2.2. Factori de risc	22
1.2.2.1. Stilul de viață	22
1.2.2.2. Bolile inflamatorii intestinale	23
1.2.2.3. Obezitatea	23
1.2.2.4. Vârsta, sexul, înălțimea	24
<b>2. Gene implicate în carcinogeneză</b>	25
2.1. Oncogene	25
2.1.1. KRAS	25
2.1.2. c-Myc	26
2.1.3. CCND1	26
2.1.4. NF-kB	26
2.1.5. STAT3	27
2.2. Gene supresoare	27
2.2.1. TP53	28
<b>3. Particularitățile celulei canceroase</b>	29
<b>4. Nutrigenomica și epigenetica în cancerul colorectal</b>	35
4.1. Modificări epigenetice	35
4.1.1. Metilarea ADN-ului	36
4.1.2. Modificări ale histonelor	36
4.1.3. MicroARN-uri non-codificante	37
4.2. Modularea dietetică a mecanismelor moleculare în cancerul colorectal	38
4.2.1. Diete hipercalorice	38
4.2.2. Compușii biologic activi	38
4.2.2.1. Curcumina	38
4.2.2.2. Resveratrolul	39
4.2.2.3. Quercitina	40
4.2.2.4. $\alpha$ -mangostinul	40
4.2.2.5. Acizii grași polinesaturați $\omega$ -3	41
4.2.2.6. Fibrele alimentare	42
4.2.3. Alți factori dietetici	42
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Obiective</b>	45
<b>2. Metodologie generală</b>	47
2.1. Studiul caz-martor	47
2.2. Studii <i>in vitro</i>	47
2.2.1. Linii celulare	48
2.2.2. Condiții de cultură	49
2.2.3. Reactivi	49
<b>3. Studiul 1 - Studiul caz-martor cu privire la stilul de viață și obiceiurile alimentare în cancerul colorectal</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Obiectiv	54
3.3. Material și metodă	54

3.3.1. Considerații etice	54
3.3.2. Caracteristicile populației țintă	54
3.3.3. Evaluarea stilului de viață	54
3.3.4. Interpretare statistică	55
3.4. Rezultate	55
3.4.1. Caracteristici generale	55
3.4.2. Alimente de origine vegetală	56
3.4.3. Alimente de origine animală	60
3.4.4. Stilul de viață	62
3.5. Discuții	62
3.6. Concluzii	66
<b>4. Studiul 2 - Evaluarea efectului citotoxic al tratamentului individual și combinat cu resveratrol și curcumină în linii celulare tumorale colorectale</b>	<b>69</b>
4.1. Introducere	69
4.2. Obiectiv	70
4.3. Material și metodă	70
4.3.1. Linii celulare și condiții de cultură	70
4.3.2. Procedura de numărare a celulelor	70
4.3.3. Tratamentul	71
4.3.4. Evaluarea citotoxicității	71
4.3.5. Validarea IC <sub>50</sub>	72
4.3.6. Evaluarea interacțiunii dintre compuși	72
4.3.7. Interpretare statistică	73
4.4. Rezultate	73
4.4.1. Efectul citotoxic al tratamentului cu resveratrol și curcumină ca agenți individuali	73
4.4.2. Efectul citotoxic al tratamentului combinat cu resveratrol și curcumină	75
4.5. Discuții	77
4.6. Concluzii	78
<b>5. Studiul 3 - Studiul de nutrigenomică privind efectul tratamentului individual și combinat cu resveratrol și curcumină în cancerul colorectal</b>	<b>81</b>
5.1. Introducere	81
5.2. Obiectiv	82
5.3. Material și metodă	82
5.3.1. Linii celulare și condiții de cultură	83
5.3.2. Tratamentul	83
5.3.3. Extracția ARN-ului	83
5.3.3.1. Obținerea lizatului celular	84
5.3.3.2. Extracția	84
5.3.3.3. Precipitarea	84
5.3.3.4. Spălarea	84
5.3.3.5. Uscarea	85
5.3.3.6. Dizolvarea și stocarea	85
5.3.4. Evaluarea calitativă și cantitativă a ARN-ului	85
5.3.4.1. Tehnica NanoDrop	85
5.3.4.2. Tehnica electroforetică utilizând Bioanalyzerul	86
5.3.5. Sinteza ADN-ului complementar	87
5.3.6. Reacția de qRT-PCR	88
5.4. Rezultate	90

5.4.1. Controlul calitativ și cantitativ al extracției ARN	90
5.4.2. Modificarea expresiei genice în linia celulară DLD-1	93
5.4.3. Modificarea expresiei genice în linia celulară Caco-2	96
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzii	103
<b>6. Discuții generale</b>	105
<b>7. Concluzii generale</b>	107
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	109
<b>REFERINȚE</b>	111
<b>ANEXE</b>	119

## Introducere

Cancerul colorectal este o boală poligenică și multifactorială care continuă să domine spectrul de afecțiuni neoplazice în țara noastră, în ciuda eforturilor crescute pentru îmbunătățirea metodelor de screening și de tratament. Elementele stilului de viață, în mod special obiceiurile alimentare, acționează ca factori determinanți importanți ai riscului de cancer fiind îndeosebi asociate cancerului colorectal, devenind astfel unul dintre cele mai importante tipuri de cancer corelate cu regimul alimentar. Studiile epidemiologice au evidențiat de-a lungul timpului faptul că obiceiurile alimentare nesănătoase, sedentarismul, fumatul și consumul de alcool cresc semnificativ riscul de a dezvolta patologie colorectală. În plus, consumul frecvent de carne roșie, în special carne procesată, alături de un aport redus de vegetale (fructe, legume, leguminoase, seminte etc) și cereale integrale contribuie semnificativ la carcinogeneza colorectală. Pe de altă parte, compușii biologic activi din dietă precum curcumina, resveratrolul, quercitina, acizii grași polinesaturați  $\omega$ -3 sau fibrele alimentare, caracteristici îndeosebi alimentelor de origine vegetală, acționează pe multiple căi moleculare implicate în carcinogeneză, oferind protecție împotriva acestei patologii.

Avansul cercetărilor din ultimele decenii în domeniul biologiei moleculare și al nutriției a îmbinat cele două științe și a generat rezultate surprinzătoare cu privire la rolul dietei ca purtătoare de informație biologică. Prin urmare, capacitatea nutrienților de a activa sau inhiba nivelele de expresie genică a devenit un domeniu de cercetare activ și dinamic. Compușii biologic activi din dietă acționează pleiotropic influențând apoptoza, proliferarea celulară, migrarea și invazia prin modularea nivelelor de expresie a oncogenelor și/sau a genelor supresoare de tumoră.

## Obiective

**Obiectivul principal** al acestei teze a fost realizarea unui studiu complex cu privire la rolul factorilor nutriționali și ai stilului de viață în cancerul colorectal, aceștia fiind factori determinanți în prevenția și tratamentul acestei patologii. Am avut în vedere atât componenta epidemiologică, care include determinarea factorilor stilului de viață și în special a obiceiurilor alimentare, care fie favorizează, fie previn apariția cancerului colorectal dar și cercetări moleculare cu privire la modul în care anumiți compuși biologic activi din alimente, precum resveratrolul caracteristic strugurilor roșii sau curcumina din turmeric, pot activa sau inhiba expresia unor gene implicate în carcinogeneză.

**Obiectivele specifice** propuse pentru a atinge obiectivul principal sunt:

1. Determinarea obiceiurilor alimentare și a elementelor stilului de viață pre-diagnostic caracteristice pacienților cu CCR în România.
2. Identificarea efectului antitumoral al compușilor naturali cu activitate biologică, ca agenți individuali sau în combinație, în cancerul colorectal, prin evaluarea *in vitro* a efectului citotoxic, antiproliferativ și proapoptotic în linii celulare tumorale colorectale.
3. Determinarea modului de interacțiune dintre compușii naturali biologic activi testați.
4. Efectuarea unor cercetări de genomică nutrițională pentru evaluarea unui set de gene implicate în modularea apoptozei și a autofagiei, ca urmare a tratamentului individual și/sau combinat cu resveratrol și curcumină.

**Cuvinte cheie: cancer colorectal, factori nutritionali, stil de viata, nutrigenomica**

## **Studiul 1. Studiul caz-martor cu privire la stilul de viață și obiceiurile alimentare în cancerul colorectal**

### **Obiectiv**

Legătura dintre stilul de viață și cancerul colorectal a fost extensiv studiată în majoritatea țărilor dezvoltate Europene și în SUA însă în țara noastră datele sunt puține. În acest sens, studiul de față are ca scop evaluarea elementelor stilului de viață pre-diagnostic la pacienții recent diagnosticați cu cancer colorectal în România. Obiectivul principal constă în identificarea frecvenței consumului alimentar a diverselor grupe alimentare atât de origine animală cât și vegetală precum: fructe și legume, leguminoase, cereale, produse lactate, carne, pește dar și a unor alimente de origine vegetală cu un conținut crescut de compuși biologic activi, cunoscuți ca având rol de protecție în această patologie. În plus, ca obiectiv secundar ne-am propus să identificăm în ce măsură modul de preparare al alimentelor este diferit în cele două grupuri. Noi informații în acest sens ar fi de interes pentru medicii oncologi, dieteticieni și asistente medicale care lucrează cu pacienți oncologici pentru a putea oferi recomandări adecvate pentru prevenție și dietoterapie.

### **Material și metodă**

Scopul primului studiu a fost determinarea obiceiurilor alimentare și a elementelor stilului de viață pre-diagnostic, caracteristice pacienților cu cancer colorectal în România. În acest sens am realizat un studiu caz-martor, condus în perioada aprilie 2015-septembrie 2017. Grupul caz a fost construit din pacienți de ambele sexe cu diagnostic recent confirmat de cancer colorectal iar grupul martor a inclus participanți din cadrul populației generale fără diagnostic neoplazic sau de boli cronice majore, în timpul dietei lor obișnuite. Subiecții incluși în studiu au completat un chestionar propriu elaborat în colaborare cu experți din domeniul Sănătății Publice care se poate consulta la Anexa 1. Acesta a inclus date cu caracter general și întrebări referitoare la stilul de viață și obiceiurile alimentare din ultimul an, având în vedere frecvența cu care au fost consumate diferitele alimente sau grupe alimentare evaluate. Toate datele au fost colectate în urma unui interviu tip "față în față", cu durata de 1-2 ore, condus de un dietetician. Au fost măsurate înălțimea, greutatea și s-a calculat pe baza acestora valoarea IMC. Analiza statistică a fost efectuată utilizând programul SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versiunea 20. Caracteristicile grupului control și ale grupului caz au fost comparate utilizând testul chi-pătrat ( $\chi^2$ ) iar testul Mann-Whitney a fost utilizat pentru a determina diferențele dintre grupuri. Rata șansei (Odds Ratio – OR) și intervalul de încredere 95% (CI) au fost calculate prin regresie logistică pentru a determina factorii dietetici de risc sau cu efect de protecție corelați cu CCR. O valoare a lui  $p < 0.05$  a fost considerată semnificativ statistică.

Protocolul de studiu a îndeplinit rigorile de etică în cercetarea științifică fiind aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca (nr. 408/02.07.2015). Consimțământul informat a fost obținut în scris de la toți participanții incluși în studiu.

## **Rezultate și discuții**

Rezultatele au arătat că există diferență semnificativ statistică între nivelul de educație al participanților din cele două grupuri, grupul control având un nivel de educație superior. În ceea ce privește IMC-ul și zona de proveniență (urban/rural) nu au fost identificate diferențe semnificativ statistice. În plus, distribuția fumătorilor în cele două grupuri a fost similară.

Studiul de față a evidențiat un consum superior al produselor din carne procesată în grupul pacienților cu CCR comparativ cu grupul martor însă în mod surprinzător nu au fost înregistrate diferențe semnificativ statistice în ceea ce privește consumul de carne roșie sau modalitățile de preparare culinară a cărnii. Cu toate că majoritatea studiilor epidemiologice au evidențiat de-a lungul timpului asocierea pozitivă dintre consumul de carne roșie și carcinogeneza colorectală, un alt studiu recent caz-martor nu a raportat diferențe între grupuri. Totuși, cel mai recent raport al OMS, în baza evidențelor științifice existente, a încadrat carnea roșie în Grupa 2A de risc, ca posibil cancerigenă iar carnea procesată în Grupa 1, ca fiind cancerigenă pentru oameni. În studiul de față rezultatele au arătat că pacienții recent diagnosticați cu CCR au obișnuit să consume mai rar alimente de origine vegetală în comparație cu participanții din grupul control. De asemenea, elementele stilului de viață sănătos s-au reflectat cu precădere printre participanții grupului control. Cu toate că aportul total de legume nu a fost diferit între grupuri, consumul legumelor crucifere (varză, conopidă, broccoli, varză de Bruixelles) și al legumelor cu frunze verzi a fost semnificativ mai mari în grupul control ( $p < 0.001$ ). Alături de acest aspect, consumul global de fructe și în special fructe roșii a fost semnificativ mai mare în grupul control. Asemeni rezultatelor obținute în urma acestui studiu, și alte cercetări au raportat o asociere pozitivă între consumul de legume cu frunze verzi și scăderea riscului de CCR. În plus, în eșantionul luat în studiu, consumul de alimente bogate în fibre, precum cerealele integrale sau leguminoasele a fost semnificativ mai frecvent în grupul control comparativ cu grupul CCR ( $p < 0.001$ ).

Studiul de față a evidențiat faptul că un consum frecvent al alimentelor și grupelor alimentare bogate în componente biologice active cum ar fi legumele crucifere, legumele cu frunze verzi, fructele roșii, ceaiul verde etc. contribuie la efectul benefic al unei diete sănătoase asupra riscului de CCR și poate contracara efectele nocive ale elementelor dietetice nesănătoase. De asemenea, am confirmat faptul că alimentele bogate în fibre, cum sunt cerealele integrale și leguminoasele sunt constituenți importanți ai unei diete de protecție împotriva cancerului colorectal.

## **Studiu 2. Evaluarea efectului citotoxic al tratamentului individual și combinat cu resveratrol și curcumină în linii celulare tumorale colorectale**

### **Obiectiv**

Tratamentul individual cu resveratrol și curcumina inhibă viabilitatea celulelor canceroase *in vivo* și *in vitro* atât în cancerul colorectal, cât și în alte tipuri de cancere. Obiectivul acestui studiu constă în investigarea efectului citotoxic individual și combinat al resveratrolului și curcuminei pe linii celulare tumorale colorectale și analizarea tipului de interacțiune dintre cei doi compuși.

## **Material și metodă**

Liniile celulare umane de cancer colorectal Caco-2 și DLD-1 au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate inițială de  $20 \times 10^3$  / godeu. După 24 de ore, la fiecare godeu s-au adăugat tratamentele individuale cu resveratrol și curcumină la diferite concentrații (5-150  $\mu\text{M}$ ). Celulele au fost incubate timp de 48 de ore. Pentru a evalua efectul combinat al curcuminei și resveratrolului, ambele linii celulare au fost tratate cu nouă concentrații succesive ale tratamentului combinat, la un raport 1: 2,5 (curcumină: resveratrol). Concentrațiile și raportul de testat au fost selectate pe baza valorilor IC50 obținute pentru tratamentul individual cu fiecare compus. Viabilitatea celulelor a fost determinată prin utilizarea testului MTT. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat.

## **Rezultate și discuții**

Rezultatele studiului de față au arătat că atât tratamentul individual cât și tratamentul combinat cu resveratrol și curcumină inhibă semnificativ viabilitatea celulară; efectul fiind dependent de concentrația tratamentului sau de raportul testat. În plus, în linia celulară DLD-1 tratamentul cu cei doi compuși are efect sinergic. Aceste date sugerează că abordarea bazată pe combinarea compușilor biologic activi la concentrații mai mici, posibil de atins prin dietă, este promițătoare în prevenție și în tratamentul oncologic însă, predictibilitatea unei combinații de compuși care să ducă la efecte sinergice este o sarcină dificilă.

## **Studiu 3. Studiul de nutrigenomică privind efectul tratamentului individual și combinat cu resveratrol și curcumină în cancerul colorectal**

### **Obiectiv**

Tratamentul individual cu resveratrol și curcumină s-a dovedit eficient în supra-exprimarea unor gene cu efect proapoptotic dar și în reducerea nivelului de expresie în cazul unor gene antiapoptotice atât în CCR cât și în alte tipuri de cancer. Rezultatele obținute în studiul anterior au arătat că ambii compuși biologic activi testați (resveratrol și curcumină) au un puternic efect citotoxic în ambele linii celulare tumorale de colon (DLD-1 și Caco-2) atât ca agenți individuali cât și în combinație. În plus, în cazul tratamentului combinat cu resveratrol și curcumină a fost evidențiat sinergism între cei doi compuși. În acest studiu ne-am propus să determinăm dacă tratamentul combinat cu resveratrol și curcumină la doze mai mici este la fel de eficient sau mai eficient în a modifica nivelul de expresie pentru o serie de gene implicate în apoptoză, comparativ cu doze mai mari dintr-un singur compus. Totodată am urmărit să identificăm mecanismele moleculare asociate efectului sinergic observat în linia celulară DLD-1 în studiul anterior.

### **Material și metodă**

Pentru realizarea studiului de nutrigenomică, a fost utilizată tehnica qRT-PCR pentru a identifica modul în care tratamentul individual și combinat cu resveratrol și curcumină influențează nivelul de expresie al unor gene de interes implicate în proliferare celulară, apoptoză, autofagie și inflamație în liniile celulare tumorale Caco-2 și DLD-1.

Nivelul de expresie genic dintr-o celulă, la un moment dat, poate fi măsurat prin numărul de copii ale unui transcript ARN (mARN) al genei de interes. Pentru a detecta și cuantifica riguros nivelul de expresie al unei gene dintr-o probă ARN, este necesară amplificarea transcripției genetice. În prima etapă, proba de ARN este procesată la ADN complementar (ADNc) cu ajutorul reacției de revers transcriere și ulterior, nivelul de expresie al genei este determinat prin metoda qRT-PCR.

Tehnica qRT-PCR are la bază tehnologia clasică a reacției de polimerizare în lanț, însă în această variantă nivelul de amplificare al unei molecule ADN (sau ADNc) se monitorizează în timp real, nu doar la sfârșitul tuturor ciclurilor de amplificare. Reacția de qRT-PCR necesită o matrice ADN (sau cADN), primeri specifici, dezoxinucleotide, o soluție tampon (buffer) și o enzimă ADN polimerază termostabilă. În plus, marcarea primerilor cu sonde fluorescente specifice genelor de interes permite vizualizarea procesului de amplificare pe măsură ce acesta înaintază.

Datele sunt exprimate grafic sub forma curbelor de amplificare prin intermediul cărora se oferă o imagine de ansamblu a întregului proces, ținând cont de intensitatea semnalului fluorescent și de numărul de cicluri de amplificare. Pentru a calcula nivelul de expresie al genei de interes, datele sunt raportate la o genă housekeeping (genă cu un nivel de expresie constant în orice condiții, în toate liniile celulare).

## Rezultate și discuții

În linia celulară DLD-1, co-tratamentul cu cei doi compuși a crescut semnificativ nivelul de expresie al genelor *BAX*, *PMAIP1*, *BID*, *ZMAT3*, *CASP3*, *CASP7* și *FAS*; nivelul de expresie determinat fiind superior comparativ cu tratamentele individuale. În mod neașteptat, atât tratamentele individuale, cât și tratamentul combinat a crescut nivelul de expresie al genelor *BCL-2*, *CCND1*, *NF-kB* și *STAT3* și a redus nivelul de expresie al genei *BBC3*. În plus, nu s-a observat un efect semnificativ la nivel de mRNA post-tratamente în cazul genelor *TP53*, *COX2* și *DRAM1*

În linia celulară Caco-2 tratamentul individual cu curcumină a crescut semnificativ nivelul de expresie al genelor *PMAIP1*, *ZMAT3*, *CASP3* și *TP53*, în timp ce tratamentul cu resveratrol a supraexprimat semnificativ genele *PMAIP1*, *BBC3*, *BID*, *ZMAT3*, *CASP3*, *CASP7*, *TP53* și *TP53INP1*. Tratamentul combinat cu resveratrol și curcumină, cu toate că a modulat semnificativ genele *PMAIP1*, *ZMAT3*, *CASP3* și *TP53INP1*, nu a avut un efect superior tratamentelor individuale. În linia celulară Caco-2, în cazul genelor *CCND1*, *NF-kB*, *COX-2* și *BAX*, tratamentele testate nu au avut efect semnificativ asupra nivelurilor mRNA. Rezultatele studiului de față au arătat că atât tratamentele individuale cu curcumină și resveratrol dar și combinația dintre cei doi compuși biologic activi, modifică semnificativ nivelul de expresie al unor gene implicate în cascada apoptotică intrinsecă, respectiv extrinsecă, elucidând astfel o parte din mecanismele moleculare prin care cei doi compuși își exercită acțiunea antitumorigenică în cancerul colorectal. În plus, a fost pus în evidență pentru prima dată sinergismul molecular dintre cei doi compuși, la nivel de mRNA, prin analiza unor gene aparținând cascadei apoptotice.



---

Summary of the doctoral thesis

# **Role of nutritional and lifestyle factors in colorectal cancer**

---

PhD Student **Biriş Laura Ioana (Gavrilaş)**

---

Scientific supervisor **Prof.dr. Corina Ionescu**

---



# Table of contents

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>REVIEW OF THE LITERATURE</b>	
<b>1. Epidemiology and etiology of colorectal cancer</b>	19
1.1. Hereditary Colorectal Cancer	20
1.2. Sporadic colorectal cancer	21
1.2.1. Mechanisms involved in carcinogenesis	21
1.2.1.1. Loss of Heterosigosity	21
1.2.1.2. Microsatellite Instability	22
1.2.1.3. CpG island methylation phenotype	22
1.2.2. Risk Factors	22
1.2.2.1. Lifestyle factors	22
1.2.2.2. Inflammatory bowel diseases	23
1.2.2.3. Obesity	23
1.2.2.4. Age, sex, height	24
<b>2. Gene involved in carcinogenesis</b>	25
2.1. Oncogene	25
2.1.1. KRAS	25
2.1.2. c-Myc	26
2.1.3. CCND1	26
2.1.4. NF-kB	26
2.1.5. STAT3	27
2.2. Tumor Suppressor Genes	27
2.2.1. TP53	28
<b>3. Hallmarks of cancer</b>	29
<b>4. Nutrigenomics and epigenetics in colorectal cancer</b>	35
4.1. Epigenetic changes	35
4.1.1. Methylation of DNA	36
4.1.2. Histone modifications	36
4.1.3. Non-coding microARNs	37
4.2. Dietary Modulation of Molecular Mechanisms in Colorectal Cancer	38
4.2.1. Hypercaloric diet	38
4.2.2. Biologically active compounds	38
4.2.2.1. Curcumin	38
4.2.2.2. Resveratrol	39
4.2.2.3. Quercetin	40
4.2.2.4. $\alpha$ -mangostin	40
4.2.2.5. $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids	41
4.2.2.6. Dietary fibers	42
4.2.3. Other dietary factors	42
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Aims</b>	45
<b>2. General Methodology</b>	47
2.1. Case-control study	47
2.2. <i>In vitro</i> studies	47
2.2.1. Cell lines	48
2.2.2. Culture conditions	49
2.2.3. Reagents	49
<b>3. Study 1 – Lifestyle factors and food groups associated with colorectal Cancer: A case-control study</b>	53
3.1. Introduction	53
3.2. Aims	54
3.3. Materials and methods	54

3.3.1. Ethical considerations	54
3.3.2. Characteristics of the target population	54
3.3.3. Lifestyle assessment	54
3.3.4. Statistical Analysis	55
3.4. Results	55
3.4.1. General characteristics	55
3.4.2. Plant-based foods	56
3.4.3. Animal-based foods	60
3.4.4. Lifestyle	62
3.5. Discussion	62
3.6. Conclusions	66
<b>4. Study 2 - Cytotoxic activity of resveratrol and curcumin on colorectal cancer cells, as single agents and in combination</b>	<b>69</b>
4.1. Introduction	69
4.2. Aims	70
4.3. Materials and methods	70
4.3.1. Cell lines and culture conditions	70
4.3.2. Cell counting procedure	70
4.3.3. Treatment	71
4.3.4. Cytotoxicity assay	71
4.3.5. Validation of IC50	72
4.3.6. Nature of interaction evaluation	72
4.3.7. Statistical Analysis	73
4.4. Results	73
4.4.1. Cytotoxic effect of treatment with resveratrol and curcumin as single agents	73
4.4.2. Cytotoxic effect of the combination treatment with resveratrol and curcumin	75
4.5. Discussion	77
4.6. Conclusions	78
<b>5. Study 3 – A nutrigenomic approach on the effect of resveratrol and curcumin treatment in colorectal cancer, as single agents and in combination</b>	<b>81</b>
5.1. Introduction	81
5.2. Aims	82
5.3. Materials and methods	82
5.3.1. Cell lines and culture conditions	83
5.3.2. Treatment	83
5.3.3. RNA Extraction	83
5.3.3.1. Cell Lysate	84
5.3.3.2. Extraction	84
5.3.3.3. Precipitation	84
5.3.3.4. Washing	84
5.3.3.5. Drying	85
5.3.3.6. Dissolving and Storing	85
5.3.4. Qualitative and Quantitative RNA Evaluation	85
5.3.4.1. RNA quantitative evaluation by Nanodrop spectrophotometer	85
5.3.4.2. Qualitative assessment of RNA with Agilent 2100 Bioanalyzer	86
5.3.5. cDNA synthesis	87
5.3.6. Gene expression analysis by RT-qPCR	88
5.4. Results	90

5.4.1. RNA extraction, quantity and quality control	90
5.4.2. Regulation of gene expression in DLD-1 cell line	93
5.4.3. Regulation of gene expression in Caco-2 cell line	96
5.5. Discussion	99
5.6. Conclusions	103
<b>6. General discussions</b>	105
<b>7. General conclusions</b>	107
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	109
<b>REFERENCES</b>	111
<b>ANNEXES</b>	119

## Introduction

Colorectal neoplasia has become a global health problem being the third most common type of cancer in the world with high morbidity and mortality rates worldwide. Incidence of colorectal cancer (CRC) is higher in developed and industrialized countries and in urban areas as well. Both dietary habits and lifestyle factors have a strong contribution in developing colorectal cancer. Also, environmental factors including sedentary lifestyle, smoking and alcohol consumption are important determinants of CRC risk. On one hand, frequent consumption of red and processed meat especially high temperature cooked meat has been associated with colorectal carcinogenesis. On the other hand, a healthy dietary pattern based on adequate intake of fruit, non-starchy vegetables and whole grains can protect from developing CRC. The proposed mechanism is mostly attributed to the bioactive food components such as: resveratrol, curcumin, quercetin, Omega-3 fatty acids etc. known for their protective properties in CRC. Moreover, caloric restriction and being physically active as part of a healthy diet has been shown to reduce tumor genesis.

## Aims

The main objective of this thesis was the realization of a complex study on the role of nutritional factors and lifestyle in colorectal cancer, these being determinants in the prevention and treatment of this pathology. We have considered both the epidemiological component, which includes the determination of lifestyle factors and, in particular, of eating habits that either favors or prevents colorectal cancer but also molecular research on how certain biologically active compounds in foods such as resveratrol characteristic of red grapes or curcumin derived from turmeric, can activate or inhibit the expression of genes involved in carcinogenesis.

**Keywords:** colorectal cancer, diet, lifestyle factors, gene expression

## **Study 1 – Lifestyle factors and food groups associated with colorectal cancer: A case-control study**

### **Aims**

The main objective of the present study was to investigate pre-diagnostic lifestyle habits (physical activity, smoking, dietary habits) of CRC patients in a Romanian sample. Our analysis aimed to evaluate the frequency of consumption of different foods and food groups together with culinary techniques and explore the possible dietary risk or protective factors associated with CRC.

## Materials and Methods

There has been designed a case-control study which was conducted in Romania from August 2015 until January 2017. The study design and study participants were described previously. Briefly, case subjects were recruited from Medisprof Oncology Hospital from Cluj-Napoca, and the inclusion criteria for the CRC group were Romanian nationality and a recent diagnostic of cancer in any region of the colon and/or rectum. The control group was recruited from generally healthy adults, following a regular diet and included participants without neoplastic diagnosis or other major chronic diseases in the present or in the past. Study groups were matched by age within a 5-year category. Each participant signed an informed consent to participate in the study.

A questionnaire was administered individually using face-to-face interviews conducted by a trained dietitian and the questions aimed to assess usual food intake over the previous year. In the absence of a validated national tool for evaluation of food intake, the applied questionnaire was established by members of the research team using validated models from other countries [9, 12]. Participants were asked to report frequency of consumption for a given food and/or food group based on weekly intake. The questions included in this analysis evaluated intake of dairy products, meat, fat, sweets and grains, together with some questions addressing culinary practices.

## Results and Discussions

This study showed that consuming plant based foods, rich in bioactive dietary components, as part of a healthy diet could be negatively associated with CRC. Even if overall consumption of vegetables and fruits was similar between groups, when comparing intake of specific type of food or food groups, we found distinct frequency patterns. Participants in the control group were more likely to consume cruciferous vegetables, red fruits, leafy vegetables, extra virgin oil, turmeric or green tea while intakes of red meat or dairy did not differ significantly. Based on our findings, intake of other fiber rich foods such as wholegrains was also significantly higher in control group compared to CRC group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, in our study, intake of legumes between groups differ significantly, with participants in the control group having more frequent intakes ( $p < 0.05$ ). This food group include mostly peas, lentils, beans, chickpeas and soybeans, of which all are powerful sources of nutrients and bioactive components that may be protective against cancer. Colorectal cancer and red meat have a long history together and the most recent report from WHO classified processed meat as carcinogenic to humans (IARC – Group 1). Interestingly, in our study, no differences were observed between groups in terms of red meat ( $p > 0.05$ ), as well as for cooking meat at high temperature (data not shown). However, intakes of processed meat differ significantly between groups ( $p < 0.001$ ) and increase the risk of CRC (Table 5). Furthermore, we observed that intakes of lean poultry meat and fish were significantly higher in the control group compared with CRC group. Likewise, regular intake of 3-5 servings/week of lean poultry meat is inversely associated with CRC risk (OR=0.37, 95% CI=0.23-0.60,  $p < 0.001$ ) along with the same weekly frequency of fish intake which also decreases CRC risk (OR=0.09, 95% CI=0.02-0.3,  $p < 0.001$ ).

Besides dietary intake, we observed that overall healthy lifestyle habits were more common in control group compared to CRC group (Table 1). In terms of physical activity, there was significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). Having an active lifestyle is known as one of the most important protective factors for CRC (Vrieling & Kampman 2010). Regular exercise reduces body fatness and therefore has a positive effect on CRC, since abdominal adiposity is strongly associated with CRC risk (Moon et al. 2008). Furthermore, participants in control group reported more frequent meals and tend to consider more often breakfast as the most important meal of the day. Even if this is not especially related to colorectal cancer, these observations may suggest the overall attention people show to dietary and lifestyle habits. There are studies suggesting that people eating smaller portions and frequent meals tend to have lower BMI and an improved diet quality (Aljuraiban et al. 2015). Taken together these findings may be of use for those

shaping dietetic recommendations for patients and people at risk, since colorectal cancer is one of the most diet-related and preventable type of cancer

## **Study 2 - Cytotoxic activity of resveratrol and curcumin on colorectal cancer cells, as single agents and in combination**

### **Aims**

The aim of the present study was to assess the cytotoxicity of curcumin and resveratrol as single drugs and in combination, on two colon cancer cell lines

### **Materials and Methods**

Human colorectal carcinoma cell lines Caco-2 and DLD-1 were seeded in 96-well plates at an initial density of  $20 \times 10^3$  /well. After 24 h, single compounds (resveratrol and curcumin) were added to each well at various concentrations (5-150  $\mu\text{M}$ ) and incubated for 48 h. To assess the combined effect of curcumin and resveratrol, both cell lines were treated with nine successive concentrations of the combination treatment, at a 1:2.5 ratio (curcumin:resveratrol). The concentrations and the ratio to be tested were selected based on the IC<sub>50</sub> values obtained for each agent alone. Cell viability was determined by using the MTT assay. The nature of interaction between curcumin and resveratrol was assessed by Combination Index (CI) analysis using the CompuSyn software (ComboSyn, Inc) based on The Chou-Talalay method (24). Synergy is defined as a CI value less than 1, whereas values greater than 1 indicate antagonism between the two agents. CI values close to 1 indicate an additive effect. All experiments were performed in triplicate.

### **Results and Discussions**

The results showed that resveratrol and curcumin significantly inhibited cell viability of both DLD-1 and Caco-2 cells in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub>s values for resveratrol were 107.2  $\mu\text{M}$  and 99.5  $\mu\text{M}$  for DLD-1 cells and Caco-2 respectively, while the IC<sub>50</sub>s values for curcumin were 57.45  $\mu\text{M}$  and 31.25  $\mu\text{M}$  for DLD-1 cells and Caco-2 respectively. The combination treatment of curcumin and resveratrol caused a greater cytotoxic effect compared to single compound treated cells. The IC<sub>50</sub>s for the combination treatment were 71.8  $\mu\text{M}$  (20.5  $\mu\text{M}$  curcumin + 51.3  $\mu\text{M}$  resveratrol) for DLD-1 cell line and 66.21  $\mu\text{M}$  (18.9  $\mu\text{M}$  curcumin + 47.3  $\mu\text{M}$  resveratrol) for Caco-2 cell line.

The combination treatment of curcumin and resveratrol was more effective in inhibiting the proliferation of both Caco-2 and DLD-1 cells when compared with the treatment of either agents alone. However, the CI value was  $<1$  for the combination treatment only for DLD-1 cell line, when the proliferation inhibition was  $>50\%$ , indicating therefore a synergistic effect. When calculating the CI for the treatments in Caco-2 cell line, we observed either an antagonist or an additive effect.

## **Study 3 – A nutrigenomic approach on the effect of resveratrol and curcumin treatment in colorectal cancer, as single agents and in combination**

### **Aims**

We hypothesize that the combination strategy with resveratrol and curcumin has a stronger gene regulating effect than either agent alone. The main objective of this study was to investigate the impact of single vs. combinatorial treatment with resveratrol and/or curcumin on gene expression profiles for the main genes related to apoptosis, on two colorectal cancer cell lines.

## Materials and Methods

Caco-2 and DLD-1 cells were grown in a 12-well plate at an initial density of  $2 \times 10^5$  cells/well. After 24h, resveratrol and curcumin was added at IC50 concentrations for individual and combinatorial treatments than incubated for 48h ( $37^\circ\text{C}$ , humidified atmosphere, 5%  $\text{CO}_2$ ). Total RNA extraction was performed using TriReagent (Sigma-Aldrich) following the classical phenol:chloroform protocol. RNA quality and quantity was evaluated with Lab on-a-chip Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The RNA Integrity Number (RIN) was calculated for each sample and was used to assess the integrity of extracted RNA. cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied BioSystems), starting from 500 ng RNA. For each PCR reaction were used 2.5  $\mu\text{l}$  of 1:10 (v/v) dilution of the first cDNA, 0.5  $\mu\text{M}$  of every primers and 0.2  $\mu\text{M}$  UPL. The PCR conditions included a 10 minute step at  $95^\circ\text{C}$  for enzyme activation followed by an amplification step including 40 cycles of 10 seconds at  $95^\circ\text{C}$ , 20 seconds at  $55^\circ\text{C}$  and 1 second at  $72^\circ\text{C}$  followed by a final cooling step at  $40^\circ\text{C}$  for 30 seconds. The expression of selected genes was calculated with  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (20) after their normalization with the RN18S1 housekeeping gene. The following primers were purchased from Primer Invitrogen (50nMol DSL, Thermo Fischer Scientific) and used for amplification as follows: BID (sense 5'- TGCAGCTCAGGAACACCA-3'; antisense 5'- TCTCCATGTCTCTAGGGTAGGC-3'), CASP3 (sense 5'-TGGAATTGATGCGTGATGTT-3'; antisense 5'- TCCAAAAATTATTCTTCTTACC-3'), CASP7 (sense 5'- CTTGGAAGAGCAAGGGACAG-3'; antisense 5'- TTATGGGCCAGGCTTACATC-3'), BAX (sense 5'-AGCAAAGTGGTCTCAAG-3'; antisense 5'- CTTGGATCCAGCCCAACA-3'), TP53 (sense 5'- CTTTGAGGTGCGTGTGTTGTG-3'; antisense 5'- CCCTTCTTGCGGAGATTC-3'), PMAIP (sense 5'- GGAGATGCCTGGGAAGAAG-3'; antisense 5'- CCAAATCTCCTGAGTTGAGTAGC-3'), BBC3 (sense 5'- GACCTCAACGCACAGTACGA-3'; antisense 5'- GAGATTGTACAGGACCCTCCA-3'), ZMAT3 (sense 5'-CCAGGAAAGAAGGGAATGAG-3'; antisense 5'- GCAAGAGCTGCAACATAACAAT-3') and FAS (sense 5'- TTTCTCAGGCATCAAAGCA-3'; antisense 5'- GGAGAGGTGGCAAAGCTCTA-3'). All experiments were performed in triplicate.

## Results and Discussions

Our results showed that lower doses of resveratrol and curcumin in combination exhibit a more potent cytotoxic and gene regulating effect compared to single treatments at higher doses, unequivocally demonstrating the cellular and molecular synergism between resveratrol and curcumin in DLD-1 colorectal cancer cells. The combinatorial treatment significantly up-regulated the pro-apoptotic genes BAX, PMAIP1, ZMAT3, CASP3 and CASP7.

Significant differences were observed in BAX gene at mRNA level following curcumin treatment alone or the combinatorial treatment in DLD-1 cell line. This up-regulating effect was not detected in Caco-2 cell line after none of the treatments; however, previous studies have reported that single treatments with resveratrol and curcumin increased BAX at mRNA level, as well as, at protein level, in other cancer cell lines including colorectal and prostate cells. As with the results obtained for BAX gene, the qRT-PCR analysis showed that resveratrol and curcumin have synergistically increased PMAIP1 and BID mRNA expression levels in DLD-1 cells, while single treatments were more effective in Caco-2 cells. Similar to our findings, overexpression of PMAIP1 mRNA following resveratrol treatment was reported in breast cancer cells, while curcumin treatment alone up-regulated PMAIP1 mRNA in prostate cancer, illustrating the apoptotic effect of both agents at molecular level. Furthermore, in the present study we evaluated the gene expression levels for effector caspase-3 and -7 after single and combinatorial treatments with resveratrol and curcumin. In DLD-1 cell line results showed greater gene expression modulation for the combinatorial treatment compared to single treatments, whereas, in Caco-2 cell line single treatments were more efficient. In the present study, we evaluated for the first time the expression level of ZMAT3 in response to curcumin and resveratrol treatments, as single agents or in combination. Our results showed that all treatments significantly up-regulated the mRNA expression in both cell lines tested and molecular synergism was observed for the combinatorial treatment in DLD-1 cell line.

We showed that the combined approach using lower concentrations from the two biologically active natural compounds can target multiple pathways and mechanisms and may be more effective in modulating apoptotic genes compared to treatments with either agents alone. The main favorable outcome of the synergistic effect was highlighted by increasing the efficacy of the therapeutic response with lowering the dosage of the compounds. Therefore, the main relevance of our research resides in demonstrating for the first time the molecular synergism between curcumin and resveratrol at mRNA level in CRC. In addition, it may be of great therapeutic value that the studied compounds are able to modulate key molecules involved in the apoptotic pathways in CRC.