
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul micromediului tumoral în rezistența la chimioterapie în cancerle colorectale metastatice

Doctorand **Alexandra Mureșan (Gherman)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Rolul micromediului tumoral în cancerul colorectal metastatic	19
1.1. Rolul micromediului tumoral în cancerogeneza și metastazarea cancerului colorectal	19
1.1.1. Micromediul tumoral și cancerogeneza neoplaziilor colorectale	19
1.1.1.1. Rolul celulelor care înfiltrează tumora	19
1.1.1.2. Rolul sistemului vascular tumoral	21
1.1.1.3. Rolul matricii extracelulare	21
1.1.2. Micromediul tumoral și metastazarea cancerului colorectal	22
1.1.2.1. Tranziția epitelial-mezenchimală	22
1.1.2.2. Angiogeneza	22
1.1.2.3. Intravazarea celulelor tumorale	22
1.1.2.4. Circulația celulelor tumorale	22
1.1.2.5. Extravazarea celulelor tumorale	22
1.1.2.6. Colonizarea situsurilor metastatice	23
1.2. Micromediul tumoral, subtipurile moleculare și tratamentul cancerului colorectal	23
1.3. Rolul micromediului tumoral inflamator în rezistența la tratamentele sistemice	24
2. Optimizarea secvenței terapeutice cu anticorpi monoclonali inhibitori ai receptorului factorului epidermal de creștere și bevacizumab după progresia bolii în cancerul colorectal metastatic, RAS sălbatic	27
2.1. Standarde de tratament sistemic în cancerul colorectal metastatic	27
2.2. Factorii predictivi pentru răspunsul la agenții anti-EGFR și bevacizumab în cancerul colorectal metastatic	28
2.2.1. Factori predictivi pentru răspunsul la agenții anti-EGFR	28
2.2.2. Factori predictivi pentru răspunsul la bevacizumab	29
2.3. Secvența terapeutică optimă a tratamentelor moleculare țintite în cancerul colorectal metastatic	29
2.3.1. Rezultatele studiilor clinice în linia 1 de tratament	29
2.3.2. Eficiența tratamentelor moleculare țintite în linia a doua de tratament după eșecul bevacizumabului	30
2.3.3. Mecanisme de rezistență la agenții anti-EGFR după progresia bolii sub bevacizumab	31

3. Noi biomarkeri de predicție a răspunsului la tratament în cancerul colorectal metastatic - rolul microARN-urilor circulante	33
3.1. Generalități despre microARN-uri	33
3.2. Generalități despre exozomi	34
3.3. Implicarea microARN-urilor în medierea inflamației și în patogeneza cancerului colorectal	34
3.4. Rezultatele studiilor de cercetare privind rolul predictiv al microARN-urilor pentru răspunsul la tratamentele sistemice	35
3.5. Limitări pentru implementarea microARN-urilor ca factori predictivi pentru răspunsul la chimioterapie	39
3.6. Provocări în uzul terapeutic al microARN-urilor	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Studiul 1 – Rolul predictiv al markerilor hematologici inflamatori pentru supraviețuire și răspuns la tratament în cancerulele colorectale metastatice K-RAS sau all-RAS sălbatic, chimiotratate	45
2.1. Introducere	45
2.2. Obiective	47
2.3. Material și metodă	47
2.4. Rezultate	50
2.5. Discuții	62
2.6. Concluzii	67
3. Studiul 2 – Eficiența agenților anti-EGFR după tratamentul anterior cu bevacizumab în cancerul colorectal metastatic KRAS sau all-RAS sălbatic	69
3.1. Introducere	69
3.2. Obiective	70
3.3. Material și metodă	70
3.4. Rezultate	72
3.5. Discuții	77
3.6. Concluzii	82
4. Studiul 3 – Rolul microARN-urilor din exozomii plasmatici în predicția răspunsului la chimioterapie în cancerul colorectal metastatic	83
4.1. Introducere	83
4.2. Obiective	84
4.3. Material și metodă	84

4.4. Rezultate	90
4.5. Discuții	105
4.6. Concluzii	109
5. Concluzii generale (sinteză)	111
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115

Cuvinte cheie: cancer colorectal, micromediu tumoral, factori predictivi, biomarkeri, chimioterapie, terapii țintite, rezistență la tratament, inflamație, microARN-uri.

INTRODUCERE

Cancerul colorectal reprezintă o importantă problemă de sănătate publică, fiind o cauză importantă de morbiditate și mortalitate oncologică la nivel mondial. Chiar dacă a fost înregistrată o scădere generală a ratei incidenței în țările cu statut socio-economic crescut, pe viitor se anticipează o tendință de creștere semnificativă a acesteia, în special la populația tânără. Aproximativ jumătate dintre pacienții cu cancer colorectal dezvoltă metastaze fie de la debutul bolii, fie după progresia acesteia, iar prognosticul în stadiul IV rămâne unul nefavorabil. Pentru ameliorarea rezultatelor terapeutice este imperios necesar ca abordarea terapeutică să fie de tipul unui „continuum de tratament”. Impedimentul major în eficiența tratamentului sistemic este reprezentat, pe de o parte, de lipsa unor biomarkeri predictivi validați pentru răspunsul la terapiile sistemice, iar pe de altă parte, de rezistența înăscută sau dobândită la tratament.

Interacțiunile dinamice complexe dintre elementele micromediului tumoral pe de o parte și dintre micromediu și celula tumorală pe de altă parte, contribuie la tumorigeneză și evoluția neoplaziei. Patogeneza cancerului colorectal este strâns legată de inflamație, atât în cazurile survenite pe boli inflamatorii intestinale preexistente, cât și în cazurile sporadice. Astfel, un micromediu inflamator contribuie atât la evoluția neoplaziei, cât și la rezistența la chimioterapie. Instalarea rezistenței la terapiile sistemice poate surveni și ca urmare a modificării micromediului tumoral de către medicamentele administrate anterior. Anumite studii preclinice și clinice sugerează că ar exista un impact al ordinii administrării terapilor țintite (anti-VEGF, anti-EGFR) asupra răspunsului la tratament.

MicroARN-urile reprezintă molecule mici de ARN implicate în reglarea posttranscripțională a expresiei genice, existente la nivel de celule tumorale, micromediu tumoral, circulant în sânge, fie libere, fie înglobate în exozomi, dar și în alte fluide biologice. Prin alterarea nivelurilor de expresie, ele pot avea atât roluri supresoare tumorale, cât și oncogene, în funcție de tipul neoplaziei și de stimulii primiți din micromediul tumoral, dar pot fi și importanți mediatori ai inflamației. Datorită implicării lor în majoritatea etapelor cancerogenezei și stabilității remarcabile chiar în condiții extreme, cercetările actuale sunt centrate pe utilizarea lor ca biomarkeri cu rol diagnostic, prognostic și predictiv pentru răspunsul la tratament.

Pornind de la stadiul actual al cunoașterii, în lucrarea de față ne-am propus identificarea de noi biomarkeri predictivi pentru supraviețuire și pentru răspunsul la tratament în cancerul colorectal metastatic care să oglindească modificările apărute la nivel de micromediu tumoral.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

În primul studiu ne-am propus identificarea de biomarkeri asociați inflamației, predictivi pentru supraviețuire (supraviețuire generală, supăraviețuire fără progresia bolii asociate primei linii de tratament) și pentru răspunsul la tratament. Este bine cunoscut rolul inflamației cronice în patogeneza cancerului colorectal, dar și în instalarea chimiorezistenței. Am stabilit ca obiective analiza valorii predictive a indicilor și scorurilor hematologice inflamatorii, folosindu-ne de hemoleucogramele recoltate înainte de debutul tratamentului sistemic de linia 1 pentru CCRm. Ulterior, am integrat biomarkerii semnificativi în analiza complexă a mai multor variabile cunoscute pentru rolul potențial în predicția supraviețuirii pacienților cu CCRm.

În al doilea studiu am pornit de la ipoteza sugerată de rezultatele mai multor studii clinice, conform căreia ordinea administrării tratamentelor moleculare țintite influențează prognosticul și supraviețuirea pacienților. Am stabilit ca obiectiv principal analiza efectului administrării de bevacizumab înainte de agentul anti-EGFR asupra parametrilor de supraviețuire la o populație cu cancer colorectal metastatic cu status mutațional K-RAS sau all-RAS nealterat.

Studiul al treilea și-a propus să investigheze rolul microARN-urilor din exozomii plasmatici ca posibili biomarkeri predictivi pentru răspunsul la tratament în cancerul colorectal metastatic. Primul obiectiv a fost de a identifica miARN-uri cu rol predictiv pentru răspunsul la tratament din probe recoltate înainte de debutul chimioterapiei de linia 1 protocol FOLFOX sau FOLFIRI. Al doilea obiectiv a fost de a evalua asocieri între nivelul microARN-urilor la un interval de 4-6 luni de la debutul protocolului de chimioterapie și răspunsul la tratament.

2. Studiul 1. Rolul predictiv al markerilor hematologici inflamatori pentru supraviețuire și răspuns la tratament în cancerule colorectale metastatice K-RAS sau all-RAS sălbatic, chimiotratate

2.1. Introducere

Printre martorii circulanți ai unui micromediului tumoral inflamator se numără indicii și scorurile inflamatorii derivate din elemente ale hemoleucogramei precum leucocitele, neutrofilele, limfocitele și trombocitele. Rolul predictiv pentru supraviețuire al markerilor hematologici a fost studiat în diverse malignități. Trombocitoza, neutrofilia

și limfopenia se asociază cu un prognostic nefavorabil, dar încă nu sunt validate ca și factori prognostici în cancerul colorectal, în timp ce rolul predictiv pentru răspunsul la tratament este mai puțin studiat.

2.2. Obiective

Un prim obiectiv al acestui studiu a fost acela de a analiza rolul predictiv pentru supraviețuirea generală (SG) și supraviețuirea fără progresia bolii asociată primei linii de tratament (PFS1) al unor indici și scoruri inflamatorii hematologice, precum și analiza integrată a acestora în contextul altor factori prognostici clinici, patologici și terapeutici în CCRm cu status al genelor K-RAS sau all-RAS nealterat. Al doilea obiectiv a fost acela de a analiza rolul predictiv al scorurilor hematologice pentru răspunsul tumoral la prima linie de tratament, conform criteriilor RECIST 1.1.

2.3. Material și metodă

Acest studiu este o analiză retrospectivă care a inclus 189 pacienți tratați în perioada ianuarie 2005 - decembrie 2017 în cadrul Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca.

Am inclus pacienți cu cancer colorectal metastatic de la diagnostic sau după recidiva bolii, cu status K-RAS exon 2 sau all-RAS nealterate, care au urmat tratament sistemic (chimioterapie, tratamente moleculare țintite) și nu au prezentat co-morbidități decompensate sau contraindicații pentru tratament. Au fost excluși pacienții cu procese inflamatorii acute sau infecții dovedite înainte de debutul primei linii de chimioterapie pentru boală metastatică sau cu alte afecțiuni asociate care să poată modifica valorile parametrilor din hemoleucograme, de asemenea pacienții aflați sub tratament cronic cu medicamente antiinflamatorii și imunosupresoare și pacienții cu neoplazii multiple sincrone.

În ce privește scorurile prognostice bazate pe inflamație obținute din elemente ale hemoleucogramei au fost definite după cum urmează: NLR = raportul dintre numărul absolut de neutrofile/ limfocite; PLR = raportul dintre numărul absolut de trombocite / limfocite; dNLR = raportul derivat din NLR, dintre numărul absolut de neutrofile / diferența leucocite - neutrofile, în valoare absolută; LMR = raportul dintre numărul absolut de limfocite / monocite; PNLR sau index sistemic imun-inflamator (SII) = raportul dintre numărul absolut de trombocite înmulțit cu numărul absolut de neutrofile / numărul absolut de limfocite; COP-NLR = co-scor format din numărul de trombocite și NLR. Clasificarea scorului COP-NLR a fost preluată din datele existente și larg utilizate în literatură. COP-NLR 2 a inclus cazurile cu un număr de trombocite $> 300 \times 10^9/L$ și $NLR > 3$; COP-NLR 1 a inclus cazurile cu un număr de trombocite $> 300 \times$

$10^9/L$ sau $NLR > 3$; COP-NLR 0 a inclus cazurile în care nici numărul de trombocite nu a fost $> 300 \times 10^9/L$, nici $NLR > 3$.

Am inclus în analiza univariată a SG și a PFS1 factori legați de pacient, de caracteristicile tumorale și de tratamentele aplicate.

Analiza statistică a fost efectuată folosind programul "MedCalc Statistical Software" versiunea 19.1.5. Datele cantitative au fost descrise prin mediane și percentilele 25-75, în timp ce datele nominale au fost exprimate prin frecvență și procente. Comparațiile între grupuri au fost efectuate prin testul Man-Whitney sau testul hi-pătrat, după caz. Analiza univariată a supraviețuirii a fost efectuată prin metoda Kaplan-Meier. Analiza multivariată a supraviețuirii a fost efectuată conform regresiei Cox. Valoarea $p < 0.05$ a fost considerată cu semnificație statistică.

2.4. Rezultate și Concluzii

În analiza univariată a supraviețuirii generale, pacienții care au avut un scor COP-NLR = 2 au avut o probabilitate mai mare deces față de cei cu un scor COP-NLR=0. Alți markeri hematologici asociați semnificativ cu supraviețuirea au fost numărul de trombocite, volumul trombocitar mediu, scorul PLR și scorul PNLR. De asemenea, pacienții cu metastaze pulmonare, peritoneale sau mai mult de două situsuri metastatice au avut o probabilitate semnificativ mai mare de deces. Pacienții la care s-a practicat chirurgia tumorii primare, rezecția/ablația metastazelor au avut o supraviețuire mai bună.

Pentru parametrii inflamatori (variabile continue) cu valoare semnificativă în analiza univariată a supraviețuirii am calculat valori prag asociate semnificativ cu creșterea mortalității. În urma aplicării acestor valori prag, singurul scor cu valoare predictivă pentru SG la pragul semnificației statistice a fost PNLR. Un număr de trombocite mai mare de $249 \times 10^9/L$ s-a asociat cu o creștere a mortalității, fără să atingă, însă, semnificația statistică.

În modelul final, analiza multivariată a supraviețuirii a arătat faptul că un indice COP-NLR 1 sau 2, prezența metastazelor pulmonare, peritoneale au determinat, independent, un prognostic infaust, în timp ce chirurgia tumorii primare și chirurgia metastazelor au fost asociate independent semnificativ statistic cu o supraviețuire mai bună. PFS1 s-a corelat indirect, semnificativ statistic, cu numărul de neutrofile și scorul NLR.

Niciunul dintre scorurile inflamatorii analizate în acest studiu nu a dovedit valoare predictivă semnificativă statistic pentru răspunsul la tratamentul de linia 1 metastatică al pacienților incluși.

3. Studiul 2. Eficiența agenților anti-EGFR după tratamentul anterior cu bevacizumab în cancerul colorectal metastatic K-RAS sau all-RAS sălbatic

3.1. Introducere

Evoluția și răspunsul la tratament al pacienților din studiile clinice în CCRm în linia a doua sau ulterioară de tratament, dublate de cele de la nivel de MMT după instalarea rezistenței la agentul țintit administrat în primă linie și de studiile experimentale sugerează existența unor mecanisme moleculare complexe și modificări la nivelul MMT după progresia tumorală sub tratament, care pe viitor trebuie să aprofundeze și integrate în procesul de decizie terapeutică. În acest studiu ne-am propus să investigăm efectul bevacizumabului pe rezultatele terapiei ulterioare cu agenți anti-EGFR.

3.2. Obiective

Obiectivul principal a fost acela de a analiza impactul administrării de bevacizumab înainte de agentul anti-EGFR asupra parametrilor de supraviețuire (supraviețuire generală, PFS asociată liniei de tratament în care a fost administrat agentul anti-EGFR). Obiectivul secundar a fost acela de a analiza impactul mai multor variabile pe SG totală a pacienților incluși în acest studiu.

3.3. Material și metodă

Acest studiu este o analiză retrospectivă care a inclus pacienți cu CCRm diagnosticați în intervalul ianuarie 2005 - decembrie 2017. Au fost incluși 85 pacienți cu cancer colorectal metastatic, status K-RAS sau all-RAS nealterat care au primit tratament cu agent anti-EGFR pentru boală metastatică evolutivă, în linia 2 sau în liniile ulterioare de tratament. Pacienții au fost împărțiți în două categorii, în funcție de tratamentul primit anterior: pacienți la care s-a administrat chimioterapie singură urmată la progresia bolii de un protocol care a inclus un agent anti-EGFR (grup A, n=22 pacienți) și pacienți la care s-a administrat chimioterapie plus bevacizumab, iar la progresie a fost administrat protocolul ce a inclus agentul anti-EGFR (grup B, n=63 pacienți). Au fost analizați, de asemenea, mai mulți factori legați de pacient, caracteristicile tumorale, tratamentele urmate, care ar putea influența supraviețuirea și răspunsul la tratament. Analiza statistică a fost efectuată similar studiului 1.

3.4. Rezultate și Concluzii

În analiză univariată, pacienții din grupul A au avut o probabilitate semnificativ mai mare de deces comparativ cu pacienții din grupul B. Pacienții cu metastaze pulmonare sau metastaze peritoneale, pacienții cu KRAS nealterat (versus all-RAS nealterat), cu tumoră primară neoperată sau pacienții care nu au avut tratament local pentru metastaze au avut o probabilitate mai mare de deces.

În analiza multivariate a supraviețuirii, prezența metastazelor peritoneale a crescut semnificativ probabilitatea decesului, iar prezența statusului all-RAS sălbatic și rezeecția tumorii primare au fost asociate cu supraviețuire crescută. Tratamentul anterior cu bevacizumab nu a mai prezentat o asociere semnificativă statistic cu o SG totală mai bună. Am calculat, de asemenea, supraviețuirea pacienților cu CCRm până la debutul liniei cu anti-EGFR, dar nu au existat diferențe semnificative între cele două brațe. Astfel, nu am demonstrat un impact semnificativ al bevacizumabului administrat anterior agenților anti-EGFR asupra eficienței terapeutice ale celor din urmă.

4. Studiul 3. Rolul microARN-urilor din exozomii plasmatici în predicția răspunsului la chimioterapie în cancerul colorectal metastatic

4.1. Introducere

Identificarea de noi biomarkeri, precum miARN-urile, ar putea reprezenta începutul unei schimbări de paradigme în abordul terapeutic al CCRm. Avantajul miARN-urilor plasmatică constă în faptul că necesită recoltarea unui volum mic de sânge, sunt extrem de stabile și pot furniza multiple date moleculare extrem de utile. Raportat la costurile atrase de folosirea lor pe scară largă, acestea ar putea fi amortizate prin o mai bună selecție a pacienților pentru terapii costisitoare.

4.2. Obiective

Obiectivul principal al acestui studiu a fost acela de a identifica miARN-uri în exozomii plasmatici cu rol predictiv pentru răspunsul la tratament, din probe recoltate înainte de debutul chimioterapiei de linia 1 protocol FOLFOX sau FOLFIRI la pacienți cu CCRm. Al doilea obiectiv a fost de a evalua asocieri între nivelul miARN-urilor la un interval de 4-6 luni de la debutul protocolului de chimioterapie și răspunsul la tratament, la pacienți aflați încă sub această linie de tratament sau dacă pacienții au avut progresia bolii, înainte de schimbarea pe linia a doua de terapie sistemică.

4.3. Material și metodă

Studiul de față a inclus 31 pacienți tratați pentru CCRm în Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, cu debut al tratamentului începând din ianuarie 2015 până în decembrie 2016, urmăriți până în ianuarie 2020 sau mai repede, dacă au decedat înainte de această dată. Pacienților li s-a administrat chimioterapie de linia 1 cu fluoropirimidină plus oxaliplatin sau irinotecan (protocol FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, XELIRI), la care s-a adăugat, la majoritatea pacienților și tratament molecular țintit anti-EGFR (cetuximab sau panitumumab) sau anti-VEGF (bevacizumab). Evaluarea răspunsului la tratament a fost realizată cel puțin lunar din punct de vedere clinic și la aproximativ 2-3 luni din punct de vedere imagistic și în funcție de răspunsul la tratament conform criteriilor RECIST 1.1., pacienții au fost grupați în două categorii, responderi (PR): răspuns complet (CR) sau răspuns parțial (PR) și non-responderi (NR): boală staționară (SD) sau boală în evoluție (PD).

Pacienților incluși în acest studiu le-au fost recoltate probe de sânge integral inițial la baseline, înainte de debutul primei linii de chimioterapie, apoi în dinamică, la aproximativ 4-6 luni de la inițierea tratamentului la pacienți aflați încă sub această linie de tratament sau, în situația pacienților cu boală în evoluție la acest interval, înainte de schimbarea liniei terapeutice.

4.4. Rezultate și Concluzii

Au fost incluse în studiu 62 de probe, 31 la baseline (B) și 31 post-chimioterapie (PC), provenite de la 31 de pacienți tratați în linia întâi metastatică cu FOLFOX (n=14) sau FOLFIRI (n=17). Dintre cele 22 de miARN candidate, 7 miARN au avut un semnal de amplificare exponențial. Șase miARN-uri, miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484 au fost considerate de interes, pentru validare pe probe individuale MiR-92a-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p și miR-484 recoltate pre-terapeutic au dovedit valoare predictivă semnificativă statistic pentru răspunsul la chimioterapia protocol FOLFOX, nu și FOLFIRI. O expresie crescută a acestor miARN-uri s-a asociat cu lipsa răspunsului la tratament, indiferent de rolul fiecăruia de oncogen sau supresor tumoral în CCR. Niciunul dintre miARN-urile analizate (miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484) recoltate în dinamică, la aproximativ 4-6 luni de la debutul chimioterapiei de linia 1 nu a putut fi asociat cu răspunsul la terapie, nici în dependență, nici independent de protocolul administrat.

5. Concluzii generale

Rezultatele studiilor de cercetare realizate în această teză contribuie, alături de cele deja raportate în literatura internațională, la identificarea și/sau confirmarea valorii de biomarkeri predictivi pentru supraviețuire sau răspunsul la tratament a unora dintre variabilele analizate.

Dintre markerii inflamatori derivați din hemoleucograme, numărul de trombocite, volumul trombocitar mediu, scorul PLR, scorul PNLR și COP-NLR au avut o valoare prognostică semnificativă statistic pentru SG în analiza univariată. După aplicarea de valori prag, singurul scor dintre acestea cu valoare predictivă pentru SG la pragul semnificației statistice a fost PNLR, astfel că, în analiza univariată, pacienții cu un scor PNLR >697,5 au avut o probabilitate mai mare de deces. În analiza multivariată, un scor COP-NLR=2 a crescut probabilitatea de deces a pacienților cu CCRm alături de alți factori, deja cunoscuți în CCRm, precum prezența metastazelor pulmonare și peritoneale, în timp ce chirurgia sau ablația prin radiofrecvență a metastazelor s-au asociat cu scăderea riscului de deces. PFS1 s-a corelat indirect, semnificativ statistic, cu numărul de neutrofile și scorul NLR, confirmând rezultatele altor studii publicate în literatură. Niciun biomarker inflamator derivat din hemoleucograme nu a fost semnificativ asociat cu răspunsul la tratament.

Rezultatele celui de-al doilea studiu au arătat faptul că nu a existat un impact semnificativ al administrării de bevacizumab asupra rezultatelor terapeutice ale agenților anti-EGFR administrați ulterior. În analiza multivariată nu administrarea bevacizumabului nu a fost responsabilă pentru supraviețuirea mai bună a pacienților la care anterior agentului anti-EGFR s-a administrat bevacizumab, ci statusul all-RAS nealterat (versus pacienți cu status N-RAS necunoscut) și rezecția tumorii primare, în timp ce prezența metastazelor peritoneale a fost asociată semnificativ cu o SG mai mică.

Analiza rolului predictiv pentru răspunsul la chimioterapie al miARN-urilor din exozomii plasmatici a arătat faptul că miR-92a-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p și miR-484 recoltați pre-terapeutic au fost asociați cu răspunsul la chimioterapia protocol FOLFOX, nu și FOLFIRI. O expresie crescută a acestor miARN-uri s-a asociat semnificativ statistic cu lipsa răspunsului la tratament. Niciunul dintre miARN-urile analizate (miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484) recoltate în dinamică, la aproximativ 4-6 luni de la debutul chimioterapiei de linia 1 nu a putut fi asociat cu răspunsul la terapie, nici în dependență, nici independent de protocolul administrat.

Sumarizând, în lumina datelor existente în literatura internațională, rezultatele cercetării noastre confirmă rolul semnificativ al unor biomarkeri predictivi pentru supraviețuire și răspuns la tratament, dar în același timp, contribuie prin rezultatele

inovatoare ale cercetării fundamentale corelate cu cercetarea clinică, la identificarea de miARN-uri predictive pentru chimiosensibilitate, respectiv chimiorezistență.

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea studiilor noastre de cercetare constă din faptul că ne-am propus să identificăm factori predictivi pentru răspunsul terapeutic și supraviețuirea pacienților cu CCRm care să oglindească implicarea micromediului tumoral în chimiosensibilitate, respectiv chimiorezistență. Din datele raportate până în prezent în literatură nu am identificat alte echipe de cercetare din țara noastră care să fi efectuat studii cu design similar în CCRm.

Cercetarea din primul studiu a fost efectuată atât datorită rezultatelor raportate în literatura internațională, cât și datorită faptului că acești biomarkeri pot fi obținuți prin metode minim invazive precum recoltarea de sânge. Din cunoștințele noastre, suntem singura echipă de cercetare la nivel internațional care a arătat valoarea predictivă pentru supraviețuire a scorului COP-NLR la pacienți chimiotrațați în CCRm.

Un alt aspect inedit al lucrării de față este reprezentat de studiul al doilea de cercetare, care a pornit de la ipoteza că, după instalarea rezistenței la bevacizumab, la nivel de micromediu tumoral se produc modificări care contribuie la rezistența la agenții anti-EGFR administrați ulterior. Rezultatele raportate în literatură până în acest moment sunt discordante, de aceea considerăm că aducem un aport la stabilirea direcțiilor de cercetare pe această temă.

Originalitatea studiului al treilea rezidă în primul rând din obiectivele propuse, de analiză a nivelurilor de expresie ale anumitor miARN-uri ca biomarkeri predictivi pentru răspunsul la chimioterapie în CCRm. Am confirmat rezultatele unor echipe internaționale în ce privește rolul predictiv pentru răspunsul la tratament al miR-92a-3p și miR-484 din exozomii plasmatici. O contribuție inovativă este identificarea miR-146a-5p și a miR-221-3p ca biomarkeri predictivi pentru răspunsul la chimioterapia FOLFOX, rezultat care, din cunoștințele noastre, nu a mai fost raportat până în prezent în literatura internațională. Un aport semnificativ la originalitatea lucrării de față a fost oferit de analiza integrată a datelor obținute prin cercetarea clinică cu cele rezultate din cercetarea moleculară.

În ansamblu, lucrarea de față își aduce aportul la avansarea direcțiilor de cercetare în domeniul medical și fundamental, cu scopul de a oferi biomarkeri de încredere și obținuți prin metode minim invazive care să contribuie la o supraviețuire mai bună și la creșterea calității vieții pacienților cu cancer colorectal metastazat.

PhD THESIS SUMMARY

The role of the tumor microenvironment in chemotherapy resistance in metastatic colorectal cancers

PhD Student: **Alexandra Mureșan (Gherman)**

PhD Scientific Coordinator **Prof.dr. Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. The role of the tumor microenvironment in metastatic colorectal cancer	19
1.1. The role of the tumor microenvironment in the carcinogenesis and metastasis of colorectal cancer	19
1.1.1. Tumor microenvironment and cancerogenesis of colorectal neoplasias	19
1.1.1.1. The role of cells that infiltrate the tumor	19
1.1.1.2. Role of tumor vascular system	21
1.1.1.3. The role of extracellular matrix	21
1.1.2. Tumor microenvironment and metastasis of colorectal cancer	22
1.1.2.1. Epithelial-mesenchymal transition	22
1.1.2.2. Angiogenesis	22
1.1.2.3. Intravasation of tumor cells	22
1.1.2.4. Circulation of tumor cells	22
1.1.2.5. Extravasation of tumor cells	22
1.1.2.6. Colonization of metastatic sites	23
1.2. Tumor microenvironment, molecular subtypes and treatment of colorectal cancer	23
1.3. The role of the inflammatory tumor microenvironment in resistance to systemic treatments	24
2. Optimization of the therapeutic sequence with anti-EGFR monoclonal antibodies and bevacizumab after disease progression in metastatic colorectal cancer, RAS wild-type	27
2.1. Systemic treatment standards in metastatic colorectal cancer	27
2.2. Predictive factors for the response to anti-EGFR and bevacizumab agents in metastatic colorectal cancer	28
2.2.1. Predictive factors for response to anti-EGFR agents	28
2.2.2. Predictive factors for the response to bevacizumab	29
2.3. Optimal therapeutic sequence of molecular treatments targeted in metastatic colorectal cancer	29
2.3.1. Results of clinical trials in first line treatment	29
2.3.2. Efficacy of molecular targeted treatments in the second line of treatment after failure of bevacizumab	30
2.3.3. Mechanisms of resistance to anti-EGFR agents after progression on Bevacizumab	31

3. New biomarkers of treatment response prediction in metastatic colorectal cancer - the role of circulating microRNA	33
3.1. Generalities about microRNAs	33
3.2. Generalities about exosomes	34
3.3. Involvement of microRNAs as mediators of inflammation and in the pathogenesis of colorectal cancer	34
3.4. Results of research studies on the predictive role of microRNAs for the response to systemic treatments	35
3.5. Limitations for the implementation of microRNAs as predictive factors for response to chemotherapy	39
3.6. Challenges in the therapeutic use of microRNAs	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis /objectives	43
2. Study 1 – Predictive role of inflammatory haematological markers for survival and treatment response in K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy	45
2.1. Introduction	45
2.2. Objectives	47
2.3. Material and method	47
2.4. Results	50
2.5. Discussion	62
2.6. Conclusions	67
3. Study 2 – Efficacy of anti-EGFR agents after previous treatment with bevacizumab in K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancer	69
3.1. Introduction	69
3.2. Objectives	70
3.3. Material and method	70
3.4. Results	72
3.5. Discussion	77
3.6. Conclusions	82
4. Study 3 – The role of plasmatic exosomal microRNAs in predicting the response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer	83
4.1. Introduction	83
4.2. Objectives	84
4.3. Material and method	84
4.4. Results	90
4.5. Discussion	105

4.6. Conclusions	109
5. General conclusions (synthesis)	111
6. Originality and innovative contributions of the thesis	113
REFERENCES	115

Keywords: colorectal cancer, tumor microenvironment, predictive factors, biomarkers, chemotherapy, targeted therapies, resistance to treatment, inflammation, microRNA.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is an important public health issue, being an important cause of oncological morbidity and mortality worldwide. Even though there has been an overall decrease in the incidence rates in countries with high socio-economic status, a significant trend of growth is expected in the future, especially in the young population. About half of all colorectal cancer patients develop metastases, either from the onset of the disease or after its progression and the prognosis in stage IV remains unfavorable. In order to improve the results, it is imperative that the therapeutic approach be of a "treatment continuum". The major impediment to the effectiveness of systemic treatments is, on the one hand, the lack of validated predictive biomarkers for response and, on the other hand, innate or acquired resistance to treatments.

Complex dynamic interactions between the elements of the tumor microenvironment and between the tumor microenvironment and the tumor cell contribute to tumorigenesis and the evolution of neoplasia. The pathogenesis of colorectal cancer is closely related to inflammation, both in cases of pre-existing inflammatory bowel disease and in sporadic cases. Thus, an inflammatory microenvironment contributes to both the evolution of neoplasia and resistance to chemotherapy. The installation of resistance to systemic therapies may also occur as a result of the changes of the tumor microenvironment induced by previously administered medicines. Certain preclinical and clinical studies suggest that there is an impact of the order of administration of targeted therapies (anti-VEGF, anti-EGFR) on the response to treatment.

MicroRNAs are small RNA molecules involved in the posttranscriptional regulation of gene expression, existing at the level of tumor cells, tumor microenvironment, circulating in the blood, either free or embedded in exosomes, but also in other biological fluids. By altered their levels of expression, they can have both tumor suppressor and oncogene roles, depending on the type of neoplasia and the stimuli received from the tumor microenvironment, but they can also be important mediators of inflammation. Due to their involvement in most stages of cancerogenesis and remarkable stability even under extreme conditions, current research is centered on their use as biomarkers with diagnostic, prognostic and predictive role for response to treatment.

Starting from the current state of knowledge, in this paper we aimed to identify new predictive biomarkers for survival and for response to therapy in metastatic colorectal cancer that mirror changes that appear in the tumor microenvironment.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis /objectives

In the first study we aimed to identify predictive biomarkers for survival (overall survival, progression-free survival associated with the first line of treatment) and for treatment response, that are associated with inflammation. The role of chronic inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer and also in the occurrence of chemotherapy resistance are well-known. The main objectives were to analyse the predictive value of inflammatory haematological indices and scores, using the complete blood counts harvested before the onset of first-line systemic treatment in metastatic colorectal cancer. Subsequently, we integrated the statistically significant biomarkers into the complex analysis of several variables known for the potential role in predicting the survival of patients with CCRm.

In the second study we started from the hypothesis suggested by the results of several clinical studies, according to which the order of administration of targeted molecular treatments influences the prognosis and survival of patients. We set as the main objective the analysis of the effect of bevacizumab administration before the anti-EGFR agent on survival parameters in a population with K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancer.

The third study aimed to investigate the role of circulating microRNAs in plasma exosomes as possible predictive biomarkers for response to treatment in metastatic colorectal cancer. The first objective was to identify predictive miRNAs for response to treatment from samples collected prior to the onset of first-line chemotherapy, FOLFOX or FOLFIRI. The second objective was to assess associations between the level of the specific microRNAs at 4-6 months after the onset of chemotherapy protocol and the response to treatment.

2. Study 1. Predictive role of inflammatory haematological markers for survival and treatment response in K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancers treated with chemotherapy

2.1. Introduction

Circulating biomarkers of an inflammatory tumor microenvironment include inflammatory parameters and scores derived from elements of complete blood counts such as leukocytes, neutrophils, lymphocytes and platelets. The predictive role for

survival of haematological markers has been studied in various malignancies. Thrombocytosis, neutrophilia and lymphopenia are associated with an unfavorable prognosis, but are not yet validated as prognostic factors in colorectal cancer, while the predictive role for response to treatment is less studied.

2.2. Objectives

The first objective of this study was to analyze the predictive role for overall survival (OS) and progression-free survival associated with the first line of treatment (PFS1) of haematological inflammatory indices and scores, as well as their integrated analysis in the context of other clinical, pathological and therapeutic prognostic factors in CCRm with K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancer. The second objective was to analyze the predictive role of haematological parameters for the tumor response to the first line of treatment, according to the RECIST 1.1 criteria.

2.3. Material and method

This study is a retrospective analysis that included 189 patients treated between January 2005 and December 2017 within the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Cluj-Napoca. We included patients with metastatic colorectal cancer from diagnosis or after relapse, with K-RAS exon 2 or all-RAS wild-type status, who underwent systemic treatment (chemotherapy, targeted molecular treatments) and did not have decompensated co-morbidities or contraindications for treatment. Patients with acute inflammatory processes or proven infections prior to the onset of the first-line chemotherapy or other associated conditions that could alter the parameter values in the complete blood counts were excluded, as well as patients undergoing chronic treatment with anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and patients with multiple synchronous neoplasias.

Regarding prognostic scores based on inflammation obtained from elements of the complete blood counts were defined as follows: NLR = neutrophil to lymphocyte ratio; PLR = platelet to lymphocyte ratio; dNLR = the ratio derived from the NLR, neutrophil to (leukocyte– neutrophil) ratio; LMR = lymphocyte to monocyte ratio; PNLR or systemic immune-inflammatory index (SII) = platelet x neutrophil per lymphocyte ratio; COP-NLR = co-score consisting of platelet count and NLR. The classification of the COP-NLR score was taken from existing and widely used data in the literature. COP-NLR 2 included cases with platelet count $> 300 \times 10^9/L$ and $NLR > 3$; COP-NLR 1 included cases with platelet count $> 300 \times 10^9/L$ or $NLR > 3$; COP-NLR 0 included cases where no platelet count was $> 300 \times 10^9/L$, neither $NLR > 3$.

We included in the univariate analysis of SG and PFS1 factors related to the patient, tumor characteristics and treatments applied.

Statistical analysis was performed using the program "MedCalc Statistical Software" version 19.1.5. Quantitative data were described by medians and percentiles 25-75, while nominal data were expressed by frequency and percentages. Comparisons between groups were made by Man-Whitney test or hi-square test, as appropriate. The univariate analysis of survival was carried out by the Kaplan-Meier method. The multivariate survival analysis was conducted according to Cox's regression. The value $p < 0.05$ was considered statistically significant.

2.4. Results and Conclusions

In the univariate analysis of overall survival, patients with a COP-NLR score = 2 had a higher probability of death than those with a COP-NLR=0 score. Other haematological markers significantly associated with survival were platelet count, mean platelet volume, PLR and PNLN scores. Also, patients with pulmonary, peritoneal metastases or more than two metastatic sites involved had a significantly higher probability of death. Patients who had surgery for the primary tumor, metastasis resection/ablation had better survival.

For inflammatory (continuous variables) parameters with significant value in the univariate analysis of survival we calculated threshold values significantly associated with increased mortality. Following the application of these threshold values, the only predictive score for overall survival at the threshold of statistical significance was the PNLN. A platelet count greater than $249 \times 10^9/L$ was associated with an increase in mortality, but did not reach statistical significance.

In the final model, multivariate analysis of survival showed that a COP-NLR 1 or 2 index, the presence of pulmonary and peritoneal metastases independently determined an unfavorable prognosis, while surgery for the primary tumor and local treatments for metastases were independently associated with better survival. PFS1 was indirectly correlated with the number of neutrophils and the NLR score.

None of the inflammatory scores analyzed in this study showed statistically significant predictive value for the response to the first-line treatment of the included patients.

3. Study 2. Efficacy of anti-EGFR agents after previous treatment with bevacizumab in K-RAS or all-RAS wild-type metastatic colorectal cancer

3.1. Introduction

The data regarding the evolution of metastatic colorectal cancer patients and their response to second and further lines therapies as seen in clinical trials, together with the informations that derive from the analyses of the tumor microenvironment after the installation of resistance to the first-line targeted agents and with the results from the experimental studies, they all suggest the occurrence of changes in the tumor microenvironment after tumor progression. These appear as a result of complex molecular mechanisms and influence the response to further therapies. These changes should be better understood and in the future, should be integrated into the therapeutic decision-making process. In the present study we set out to investigate the effect of bevacizumab on the results of subsequent therapy with anti-EGFR agents.

3.2. Objectives

The main objective was to analyse the impact of bevacizumab administered prior to the anti-EGFR agent on survival parameters (OS, PFS1 of the treatment line in which the anti-EGFR agent was administered). The secondary objective was to analyse the impact of several other variables on total OS of the patients included in this study.

3.3. Material and method

This study is a retrospective analysis that included patients with metastatic colorectal cancer diagnosed between January 2005 and December 2017 and treated in our institution. We included 85 patients with metastatic colorectal cancer, K-RAS or all-RAS gene status wild-type. They received treatment with an anti-EGFR agent for progressive metastatic disease in second or further line treatment. Patients were divided into two categories, depending on the treatment previously received: patients receiving chemotherapy alone followed at disease progression by a protocol that included an anti-EGFR agent (group A, n=22 patients) and patients receiving chemotherapy plus bevacizumab followed at disease progression by a protocol that included the anti-EGFR agent (group B, n=63 patients). Several patient-related factors, tumor characteristics, treatments followed, which could influence survival and response to treatment were also analysed. Statistical analysis was performed similar to study 1.

3.4. Results and Conclusions

In the univariate analysis of survival, patients in group A had a significantly higher probability of death compared to patients in group B. Patients with pulmonary metastases or peritoneal metastases, patients with unaltered KRAS known (versus all-RAS unaltered), unoperated primary tumour or patients who did not have local treatment for metastases were more likely to die.

In the multivariate analysis of survival, the presence of peritoneal metastases significantly increased the probability of death and the presence of wild-type all-RAS and primary tumor resection were associated with increased survival. Previous treatment with bevacizumab no longer showed a statistically significant association with a better total OS. We also calculated the survival of patients up to the onset of the anti-EGFR line, but there were no significant differences between the two groups. Thus, we have not demonstrated a significant impact of bevacizumab previously administered to anti-EGFR agents on the therapeutic efficacy of the latter.

4. Study 3. The role of circulating microRNAs in plasma exosomes in predicting tumor response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer

4.1. Introduction

Identifying new biomarkers, such as miRNAs, could be the beginning of a paradigm shift in the therapeutic approach of metastatic colorectal cancer. Some of the advantages of exosomal plasmatic miRNAs consists in the fact that they require the collection of a small volume of blood, are extremely stable and can provide multiple extremely useful molecular data. Compared to the costs of their widespread use, they could be cushioned by better selection of patients for expensive therapies.

4.2. Objectives

The main objective of this study was to identify microRNAs in plasma exosomes that are potentially predictive of treatment response from samples collected prior to the onset of first-line treatment (protocol FOLFOX or FOLFIRI) in patients with metastatic colorectal cancer. The second objective was to evaluate associations between the level of the studied microRNAs at 4-6 months after the onset of chemotherapy and response to treatments, in patients still receiving the first-line therapy or, if they had disease progression, before the switch to second-line systemic therapy.

4.3. Material and Method

This study included 31 patients treated for metastatic colorectal cancer in the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca, with the start of treatment from January 2015 to December 2016, administered until January 2020 or sooner if they died before that date. Patients received first-line chemotherapy with fluoropyrimidine plus oxaliplatin or irinotecan (FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, XELIRI), plus in most patients, targeted anti-EGFR (cetuximab or panitumumab) or anti-VEGF (bevacizumab) therapies. The assessment of the response to treatments was carried out at least monthly from a clinical point of view and the radiological assessments were performed every 3-4 months. The response was interpreted according to RECIST 1.1. criteria and we grouped into two categories, as follows: responders (PR): complete response (CR) or partial response (PR) and non-responders (NR): stable disease (SD) or progressive disease (PD).

Patients' samples were initially obtained at baseline, before the onset of the first-line chemotherapy, then at approximately 4-6 months after initiation of treatment, while they were still following this protocole, or, in patients developing disease progression during this interval, before the change of the therapeutic line.

4.4. Results and Conclusions

31 metastatic colorectal cancer patients were included in the study and 62 samples were analysed, 31 obtained at baseline (B) and the remainder 31 at 4-6 months after first-line chemotherapy start (PC). The chemotherapy administered was either FOLFOX (n=14), or FOLFIRI (n=17). Of the 22 candidate miRNA, 7 miRNA had an exponential amplification signal. Six miRNAs: miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484 were considered of interest, for validation on individual samples. Our results showed that baseline levels of miR-92a-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p and miR-484 were statistically significant associated with the response to chemotherapy protocol FOLFOX, but not with FOLFIRI. An increased expression of these miRNA was associated with a lack of response to treatment, regardless of the role of each microRNA (oncogenic or tumor suppressor). None of the analyzed miRNAs' levels (miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484) at approximately 4-6 months after the onset of first-line chemotherapy could be associated with the response to therapy, neither in a depending, nor in an independent manner in relation with the type of the chemotherapy protocol administered.

5. General conclusions

The results of the research studies carried out in this thesis contribute, together with those already reported in the international literature, to the identification and/or confirmation of the value of some predictive biomarkers for survival or response to treatments in metastatic colorectal cancer.

Among the inflammatory markers derived from complete blood counts, the platelet count, average platelet volume, PLR score, PNLR score and COP-NLR had a statistically significant predictive value for OS in univariate analysis. After the application of thresholds for the continuous variables, in order to better stratify the patients, the only score that maintained a predictive value for OS was the PNLR, so that in the univariate analysis, patients with a PNLR score > 697.5 had a higher probability of death, at the limit of statistical significance. In multivariate analysis, a COP-NLR=2 score increased the likelihood of death, along with other factors already known, such as the presence of pulmonary and peritoneal metastases, while surgery or radiofrequency ablation of metastases were associated with decreased risk of death. PFS1 correlated indirectly, statistically significant with the number of neutrophils and the NLR score, confirming the results of other studies published in the literature. No inflammatory biomarker derived from complete blood counts was significantly associated with the response to the therapies administered.

The results of the second study showed that there was no significant impact of bevacizumab administration on the therapeutic results of subsequent anti-EGFR agents. In the multivariate analysis, the administration of bevacizumab was not responsible for the better survival of patients who received it prior to the anti-EGFR agent, but this was the consequence of other factors, such as the unaltered all-RAS status (versus patients with unknown N-RAS status) and the resection of the primary tumor, while the presence of peritoneal metastases was significantly associated with a lower OS.

Analysis of the predictive role for the response to chemotherapy of exosomal plasmatic miRNAs showed that the levels of baseline, pre-therapeutically miR-92a-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p and miR-484 were associated with a favourable response to FOLFOX chemotherapy, but not with FOLFIRI. An increased expression of these miRNAs was statistically significantly associated with a lack of response to treatment. None of the analyzed miRNAs (miR-146a-5p, miR143-3p, miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-221-3p, miR-484), collected at approximately 4-6 months after the onset of first-line chemotherapy could be associated with the response to therapy, either depending on or independent manner to the protocol administered.

Summarizing, in the light of existing data in the international literature, the results of our research confirm the significant role of predictive biomarkers for survival

and response to treatment, but at the same time contribute through the innovative results obtained in the third study, to the identification of predictive miRNAs for tumour response to treatment.

6. Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of our research studies lies in the fact that we set out to identify predictive factors for the therapeutic response and survival of patients with metastatic colorectal cancer, that mirror the involvement of the tumor microenvironment in chemosensitivity and chemoresistance. From the data reported so far in the literature we have not identified any other research teams in our country that have conducted studies with similar design in this population.

The research in the first study was carried out both because of the results reported in the international literature and because these biomarkers can be obtained by minimally invasive methods such as blood collection. To our knowledge, we are the only international research team that has shown the predictive survival value of the COP-NLR score in metastatic colorectal cancer patients, prior to the receipt of first-line chemotherapy.

Another novel aspect of the present paper is the second research study, which started from the hypothesis that, after the installation of resistance to bevacizumab, changes are produced at the level of the tumor microenvironment that contribute to resistance to the anti-EGFR agents administered subsequently. The results reported in the literature so far are discordant, which is why we believe that we are making a contribution in establishing research directions on this subject.

The originality of the third study lies primarily in the proposed objectives, of analysing the expression levels of certain miRNAs as predictive biomarkers for the response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer. We confirmed the results of some other international teams regarding the predictive role for the response to treatment of miR-92a-3p and miR-484 in plasma exosomes. An innovative contribution is the identification of baseline miR-146a-5p and miR-221-3p as predictive biomarkers for the response to FOLFOX chemotherapy, a result that, to our knowledge, has never been reported before. A significant contribution to the originality of this work was provided by the integrated analysis of the data obtained through clinical research with those resulting from molecular research.

Overall, this paper contributes to the advancement of medical and fundamental research directions, with the aim of providing reliable biomarkers obtained by minimally invasive methods, that contribute to better survival and quality of life of patients with metastatic colorectal cancer.