

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**



TEZĂ DE DOCTORAT

– REZUMAT –

***EVALUAREA ANGIOGENEZEI LA PACIENȚII CU
CANCER COLORECTAL PE BAZA ENDOMICROSCOPIEI
CONFOCALE LASER (CLE) EX VIVO- IN VIVO ȘI A
TEHNICILOR IMUNOHISTOCHIMICE***

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. ADRIAN SĂFTOIU**

**Student doctorand,
ADRIANA- MIHAELA CIOCÂLTEU**

**CRAIOVA
2015**

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ (STADIUL CUNOAȘTERII)

CAPITOLUL I

Epidemiologia cancerului colorectal

CAPITOLUL II

Inovații în cancerul colorectal: de la prevenție și diagnostic la tratament și monitorizare

II.1. Screeningul cancerului colorectal

II.2. Tehnologii endoscopice actuale pentru diagnosticul cancerului colorectal

II.3. Aplicații clinice pentru depistarea precoce a neoplaziei

II.4. Evaluarea marginilor tumorii și a invaziei în profunzime

II.5. Tratamentul actual al cancerului colorectal

CAPITOLUL III

Markeri angiogenetici în imunohistochimie cu rol prognostic pentru cancerul colorectal

PARTEA SPECIALĂ (CONTRIBUȚII PROPRII)

OBIECTIVE

MATERIALE ȘI METODE. REZULTATE. DISCUȚII

1. *Studiu Imunohistochimic*- Rolul markerilor endoteliali imunohistochimici CD31 și CD105 în cancerul colorectal
2. *Endomicroscopia confocală laser (CLE)*
 - 2.1. Evaluarea unor noi parametri morfometrici ai neoangiogenezei în cancerul colorectal cu ajutorul CLE și al markerilor panendoteliali marcați fluorescent- Model Tridimensional *Ex Vivo*
 - 2.2. Evaluarea neoangiogenezei la pacienții cu cancer colorectal cu ajutorul CLE și al anticorpilor anti-CD105 marcați fluorescent- Studiu *Ex Vivo*
 - 2.3. CLE combinată cu anticorpi anti-CD105 marcați fluorescent pentru studiul *in vivo* al angiogenezei cancerului colorectal

CONCLUZII FINALE

BIBLIOGRAFIE

CUVINTE CHEIE

Cancer colorectal, neoangieneză, analiză morfometrică, marker panendotelial, anticorpi anti-CD105, tehnici endoscopice avansate, endomicroscopia confocală laser.

PARTEA GENERALĂ (STADIUL CUNOAȘTERII)

CAPITOLUL I

EPIDEMIOLOGIA CANCERULUI COLORECTAL

Cancerul colorectal rămâne a doua cauză de deces prin cancer în lume, deși face parte din tumorile maligne ce beneficiază de terapie țintită [1, 2]. În pofida multitudinii de studii deja existente despre utilizarea largă a anticorpilor sau a genelor cu potențial prognostic și despre trialuri clinice care includ cele mai noi terapii țintite, această patologie rămâne problematică sub aspectul incidenței și al mortalității crescute. Totuși, cancerul colorectal are o rată mare de curabilitate atunci când este diagnosticat într-un stadiu precoce, înainte de invazia ganglionară.

CAPITOLUL II

INOVAȚII ÎN CANCERUL COLORECTAL: DE LA PREVENȚIE ȘI DIAGNOSTIC LA TRATAMENT ȘI MONITORIZARE

Detecția precoce alături de stadializarea cu acuratețe a cancerului reprezintă piatra de temelie ce conduce către scăderea costului și a invazivității tehnicilor curative și, în consecință, la îmbunătățirea prognosticului pacienților. Colonoscopia cu lumină albă, deși considerată în prezent metoda diagnostică de elecție pentru depistarea cancerului colorectal, este departe de a fi o tehnică ideală pentru diagnosticul, caracterizarea și confirmarea acestuia în stadiul în care să poată orienta rezecția doar atunci când este necesar. Așadar, ar fi necesară o abordare complexă care să includă *programe de screening eficiente, metode terapeutice și proceduri de diagnostic moderne*, minim- invazive și rentabile economic.

Principalul scop al acestui capitol este să adreseze tehnici endoscopice minim invazive noi ce pot aduce contribuții la prevenția, diagnosticul, stadializarea și monitorizarea eficientă a cancerului colorectal, cu accent pe rolul actual al *endomicroscopiei confocale laser*.

II.1. SCREENINGUL CANCERULUI COLORECTAL

Testarea hemoragiilor oculte în materiile fecale, examinarea colonoscopică sau sigmoidoscopică, fie ca screening întâmplător, fie prin implementarea unor programe de screening în populație, au crescut șansele depistării și rezecției polipilor adenomatoși, precum și șansele diagnosticului tumorii într-un stadiu precoce, cu posibilitatea unui prognostic mai bun.

În ultimii ani, multiple tehnici inovative au fost luate în considerare pentru screeningul cancerelor gastrointestinale, incluzând cancerul colorectal, însă în prezent nu se poate renunța la examenul histopatologic pentru a confirma diagnosticul [3].

Endomicroscopia confocală laser (CLE) a câștigat rapid teren, fiind luată în considerare ca potențial adjuvant la endoscopia convențională pentru prelevarea de biopsii optice *in vivo* facilitând astfel

examinarea histologică în timp real a straturilor superficiale ale tractului gastrointestinal. Sunt în curs de cercetare studii extinse pentru a stabili eficiența acestei tehnici în screeningul, monitorizarea, diagnosticul într-un stadiu precoce al leziunilor colonului [4]. În prezent, utilizarea endomicroscopiei confocale laser în scopul screeningului și al monitorizării este limitată de câmpul vizual îngust și de capacitatea de pătrundere în țesut redusă al dispozitivelor existente, precum și de costul ridicat [5].

II.2.TEHNologii ENDOSCOPICE ACTUALE PENTRU DIAGNOSTICUL CANCERULUI COLORECTAL

Endomicroscopia confocală laser (CLE) este o tehnologie promițătoare pentru diagnosticul precoce în timp real al modificărilor patologice din mucoasa gastrointestinală. În prezent, există două sisteme CLE disponibile. Primul (eCLE, Pentax, Tokyo, Japan) constă în integrarea unui microscop confocal în partea distală a unui endoscop standard. Cel de-al doilea sistem disponibil presupune utilizarea de miniprobe confocale (pCLE, Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France) care se introduce prin canalul de lucru al endoscopului. Acesta din urmă este primul și singurul CLE compatibil cu toate video-endoscoapele flexibile disponibile și care permite, în plus, trecerea rapidă de la diagnostic la proceduri terapeutice minim invazive cum este cazul rezecției endoscopice mucozale (EMR) [6]. Ultra high definition (UHD) ColoFlex™ este ultimul model pCLE dedicat pentru investigarea colonului. Spre deosebire de alte tehnici optice noi, marele avantaj al CLE este acela de a permite evaluarea la nivel celular și subcelular a structurilor mucoasei tubului digestiv în timpul examinării endoscopice.

II.3. APLICAȚII CLINICE PENTRU DEPISTAREA PRECOCE A NEOPLAZIEI

În ultima vreme, a existat o abundență de studii care promovează **Endomicroscopia Confocală Laser** drept tehnică promițătoare pentru detectarea neoplaziei la nivelul tractului digestiv [6]. Clasificarea Miami stabilită cu ajutorul pCLE este considerată în prezent un standard de referință care descrie criteriile pentru recunoașterea mucoasei normale, a polipilor hiperplazici, a adenoamelor și respectiv a adenocarcinoamelor [7].

Utilizarea *fluoresceinei ca substanță de contrast* poate ajuta la diferențierea leziunilor neoplazice de cele non-neoplazice pe baza caracteristicilor morfometrice ale rețelei microvasculare.

Recent, într-un raport consensual preliminar bazat pe o serie de evidențe clinice ale rolului CLE în cancerul colorectal s-a susținut o acuratețe crescută pentru clasificarea histopatologică în timp real a neoplaziei colorectale *in situ* și utilizarea de încredere a criteriilor CLE pentru diferențierea mucoasei normale de polipii hiperplazici/ adenomatoși (displazici) și respectiv de cancer, cu excepția criteriilor pentru neoplazia din polipii serati care necesită validare în viitorul apropiat [8].

Progresul tehnicilor imagistice în domeniul acestei patologii atrage după sine necesitatea de a stabili markeri adiționali cu caracter prognostic și predictiv pentru o gestionare mai eficientă a leziunii primare.

Așadar, o aplicație extinsă promițătoare a CLE pentru diagnosticul precoce al cancerului colorectal ar putea fi utilizarea unor **peptide conjugate cu agenți fluorescenți** care să vizeze celulele displazice.

În această lucrare, am demonstrat capacitatea CLE de a evidenția modificări ale structurii microvasculare tumorale corespunzător tehnicilor standard histopatologice, utilizând această tehnică în combinație atât cu anticorpi panendoteliali marcați fluorescent (CD31), cât și cu anticorpi endoteliali selectivi (CD105) pe biopsii pereche proaspăt recoltate (țesut normal și țesut malign colorectal) [9, 10]. De asemenea, a fost testată fezabilitatea in vivo la pacienți cu cancer colorectal [11]. Acest progres ar putea avea impact major prin adăugarea unei analize funcționale aspectului morfologic al procesului neoplazic, precum și printr-un aport considerabil de la diagnostic la prognostic și tratament țintit antiangiogenetic.

II.4. EVALUAREA MARGINILOR TUMORII ȘI A INVAZIEI ÎN PROFUNZIME

În aceeași măsură, **CLE** poate fi folosită pentru clasificarea leziunilor colorectale și delimitarea marginilor pentru o eventuală aplicare eficientă a EMR/ESD, iar CLE împreună cu cromografia virtuală poate ghida în timp real extinderea intervenției terapeutice pentru neoplazia reziduală post-EMR [12].

Mai mult chiar, CLE a fost considerată suficientă pentru a orienta strategia de rezecție terapeutică în caz de diagnostic al carcinomului intramucos sau de displazie de grad înalt [12]. De curând, un consens al experților a susținut că pCLE ar trebui luată în considerare pentru diagnosticul neoplaziei intramucoase în strânsă legătură cu decizia terapeutică, evaluarea extinderii leziunii, precum și cu supravegherea după rezecția endoscopică, dar pentru a fi aplicată în practica zilnică necesită validarea în ghidurile societăților științifice [13].

II.5. TRATAMENTUL ACTUAL AL CANCERULUI COLORECTAL

În stadiile avansate ale acestei patologii, pacienții au un prognostic prost din cauza ineficienței tratamentului disponibil și, din acest punct, evoluția bolii nu mai poate fi prezisă cu exactitate prin factori de prognostic uzuali cum sunt invazia ganglionară, dimensiunile tumorii sau extensia locală. Cum angiogeneza joacă un rol esențial în dezvoltarea locală și la distanță a cancerului, inhibitorii angiogenezei reprezintă o strategie promițătoare pentru acești pacienți.

CAPITOLUL III

MARKERI ANGIOGENETICI ÎN IMUNOHISTOCHEMIE CU ROL PROGNOSTIC PENTRU CANCERUL COLORECTAL

Dincolo de confirmarea diagnosticului, furnizarea de informații prognostice și chiar prezicerea răspunsului la chimioterapia standard sau, mai nou, la terapia moleculară țintită, au devenit scopuri din ce în ce mai populare în imunohistochimie [14]. Astfel, aceasta a virat rapid către confirmarea de markeri prognostici, plecând de la descoperirea diverselor molecule cu rol reglator alături de anticorpii specifici corespondenți.

Pâna acum, în cancerul colorectal, au fost publicate rezultate controversate despre analiza imunohistochimică a vaselor de sânge și despre valoarea prognostică a diverșilor parametri angiogenetici. Aparent, principala cauză ar fi variația de la un marker la altul și diferențele cauzate de metodele de analiză variate. Ar mai putea fi implicate complexitatea mecanismelor de proliferare a vaselor tumorale, spectrul larg de imunoreactivitate în funcție de fiecare marker și intervalul de monitorizare [15]. Odată cu progresul către strategii terapeutice bazate pe anticorpi, au fost descrise câteva potențiale ținte, însă informația despre valoarea lor prognostică este limitată în literatura de specialitate [16]. Astfel, determinarea unor markeri în viitor care să contribuie la înțelegerea în profunzime a cursului natural al bolii și, în consecință, la creșterea ratei de supraviețuire, este importantă. Totodată, acești markeri ar putea fi ținte terapeutice.

Așadar, se estimează ca unii dintre acești biomarkeri cu rol prognostic să fie în viitor translați în sfera tehnicilor imagistice de tipul endomicroscopiei confocale laser, ecografiei, tomografiei cu emisie de pozitroni etc.

Bineînțeles, este necesară testarea la pacienți umani “*in vivo*” a posibilității aplicării unor biomarkeri validați în imagistică [9].

Scopul acestui capitol este să rezume statusul actual și să discute perspective de viitor al unor markeri angiogenetici investigați imunohistochimic care ar putea avea potențial prognostic pentru pacienții cu cancer colorectal [17].

PARTEA SPECIALĂ (CONTRIBUȚII PROPRII)

Studiul de tip prospectiv a inclus un total de 59 pacienți cu tumori colorectale diagnosticați la Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova și Clinicile de Chirurgie I și III ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, în intervalul decembrie 2011- martie 2015.

Pe parcursul desfășurării studiului, am încercat să răspund la următoarele întrebări:

1. Se corelează caracteristicile *descriptive* ale microvascularizației tumorale, susținute de studiile de specialitate, cu determinările pe baza *ecuațiilor matematice*, incluzând lungimea vaselor, tortuozitatea și ramificarea rețelei vasculare maligne colorectale?
2. Poate CLE în asociere cu markerul endotelial CD105 să ofere o analiză satisfăcătoare atât din punct de vedere *calitativ* cât și *cantitativ* a vaselor *nou formate*, comparativ cu markerii panendoteliali tradiționali?
3. În ce măsură ar fi fezabilă translatarea acestei metode *in vivo* pentru o caracterizare rapidă a microvascularizației tumorale?

Sublotul 1

1. Studiul imunohistochimic - Rolul markerilor endoteliali imunohistochimici CD31 și CD105 în cancerul colorectal

Scopul acestui studiu a fost aprecierea celor doi markeri ai angiogenezei, CD31 și CD105, ca potențiali indicatori prognostici în cancerul colorectal, evaluând relația acestora de dependență cu factori clinico-patologici.

Material și metode: Am realizat studiul imunohistochimic de tip retrospectiv pe sublotul de 43 pacienți (37 bărbați și 6 femei) cu adenocarcinom colorectal confirmat histopatologic, care au suferit intervenție chirurgicală cu rezecția tumorii principale. Țesutul prelevat a fost fixat în formalină neutră tamponată și inclus la parafină, iar blocurile obținute au fost tăiate și colorate cu Hematoxilină- Eozină. Secțiuni seriate au fost ulterior utilizate pentru evaluarea expresiei imunohistochimice a markerilor endoteliali CD31, respectiv CD105, calculându-se aria vasculară și densitatea vasculară (MVD) pe 380 imagini imunohistochimice. Valorile MVD și aria vasculară au fost exprimate ca media± deviația standard, normalizate la 1 mm², apoi am evaluat posibilitatea existenței unei legături între cei doi parametrii vasculari și factorii clinico-patologici (deces/în viață la finalul studiului, prezența anemiei și semne de inflamație- leucocitoză/VSH crescut- în momentul diagnosticului, stadiul tumoral postoperator- pTNM, grading tumoral- G) cu ajutorul testelor t al lui Student și ANOVA.

Rezultate: Am identificat o diferență semnificativă între pacienții care au decedat și cei care erau în viață la finalul studiului în ceea ce privește MVD- CD105 (p=0.008). În schimb, nu am putut demonstra existența unei diferențe semnificative între pacienții care au decedat și cei care erau în viață la finalul studiului în ceea ce privește MVD- CD31 (p=0.060). De asemenea, am întâlnit o diferență semnificativă în ceea ce privește procentul din aria vascularizată pentru CD31 între pacienții care au prezentat semne de inflamație în momentul diagnosticului și cei care nu au prezentat (p=0.003).

Concluzii: Markerul panendotelial CD31 folosit în mod curent pentru cuantificarea MVD nu evidențiază cu acuratețe angiogeneza tumorală. Determinarea angiogenezei tumorale cu ajutorul MVD-CD105 are valoare informativă independentă pentru prognosticul pacienților cu cancer colorectal și ar putea fi folositor ca biomarker pentru conturarea strategiei de terapie adjuvantă individualizată. Am identificat existența unei legături între MVD-CD105 și mortalitatea pacienților cu cancer colorectal. Studiul imunohistochimic este limitat prin faptul că activitatea markerilor specifici pentru endoteliul activat, de tipul CD105, depinde de procesul de fixare în cazul biopsiilor incluse la parafină.

2. Endomicroscopia confocală laser (CLE)

Sublotul 2

2.1. Evaluarea unor noi parametri morfometrici ai neoangiogenezei în cancerul colorectal cu ajutorul CLE și al markerilor panendoteliali marcați fluorescent- Model Tridimensional *Ex Vivo*

Scopul acestui studiu a fost evaluarea cu ajutorul endomicroscopiei confocale a noi parametri morfometrici vasculari în cancerul colorectal, dificil de evaluat prin tehnicile convenționale de imunohistochimie.

Material și metode: Din totalul de 59 de pacienți incluși în studiul de tip prospectiv, 17 pacienți (13 bărbați și 4 femei) cu media de vârstă de 61 ani ± 12.8 , au acceptat să semneze consimțământ informat pentru recoltarea de biopsii colonice în scopul evaluării ulterioare cu ajutorul CLE. Au fost excluși din studiu 3 pacienți care au prezentat determinări secundare (2 pacienți cu metastaze hepatice, 1 pacient cu metastaze pulmonare), rămânând un total de 14 pacienți (cei 13 cu cancer de rect și un pacient cu neoplasm de jonțiune rectosigmoidiană). S-au prelevat biopsii pereche (mucoasă de aspect normal și tumoral) de la cei 14 pacienți, înainte de a fi supuși oricărui tratament, inițial diagnosticați cu cancer colorectal (grad histologic G1-G2) în timpul unei colonoscopii standard și urmăriți ulterior din punct de vedere al demersului terapeutic. Au fost utilizați anticorpii panendoteliali anti-CD31 marcați fluorescent atât pentru identificarea și cuantificarea vaselor din țesut normal, cât și pentru cele tumorale (112 probe de țesut), selectând imagini CLE seriate care au fost compactate într-o singură imagine cu aspect 3D, pentru fiecare pacient. S-a analizat *offline* semnalul fluorescent cu ajutorul unui program de procesare a imaginilor. Pentru a ține cont de eterogenitatea fiecărei probe, măsurătorile s-au realizat în cadrul a două zone de interes dreptunghiulare (cu dimensiunile $50 \times 475 \mu\text{m}$ fiecare) centrate pe fiecare imagine în direcție verticală și orizontală. Parametrii morfometrici au fost măsurați pentru fiecare zonă de interes prestabilită și raportați apoi la volumul total astfel încât să se obțină o singură valoare pentru fiecare probă în parte, iar rezultatele finale au fost raportate ca medie \pm eroare standard.

Rezultate: Diametrul vascular mediu în țesutul normal a fost de $7.65 \pm 0.4 \mu\text{m}$, în timp ce în tumoră am obținut un diametru de $10.41 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($p=0.0005$). Densitatea vasculară a fost semnificativ mai mare în cancerul colorectal ($5022.5 \pm 344 \text{ vase/mm}^3$) decât cea din mucoasa colorectală normală ($3452.6 \pm 279.7 \text{ vase/mm}^3$, $p=0.0015$). Aceste rezultate validate imunohistochimic, fără a exista diferențe semnificative statistic între cele două tehnici. Am calculat un indice de tortuozitate de 1.04 ± 0.03 în țesutul normal (lungimea vasculară medie $30.88 \pm 1.97 \mu\text{m}$) și 0.9 ± 0.02 în tumoră (lungime vasculară medie de $26.08 \pm 1.5 \mu\text{m}$), rezultate care nu au fost semnificative statistic ($p=0.949$). Raportul fiică/mamă a fost de 1.22 ± 0.06 în biopsiile normale, în timp ce în tumoră am obținut o valoare medie similară, 1.17 ± 0.05 ($p=0.932$).

Discuții și concluzii: În general, microvascularizația tumorală este descrisă în studii numai din punct de vedere al diametrului vascular și al densității deoarece aceste caracteristici pot fi măsurate pe secțiunile histologice. Rezultatele examenului imunohistochimic din acest studiu au fost concludente cu cele din literatura de specialitate (vase mai dilatate și arii vasculare mai mari în tumoră decât în țesutul normal) [18]. Am evaluat în plus cu ajutorul CLE parametri ai volumului vascular, lungimea vaselor, indicele de tortuozitate și raportul fiică/mamă, care au putut fi estimați cu ușurință datorită capacității CLE de scanare în profunzime a țesutului. *Aceasta este prima atestare a indicelui de tortuozitate vasculară și a raportului fiică/mamă din studiul microvascularizației tumorale colorectale.*

Deși pe secțiunile optice confocale, vasele sanguine maligne sunt aparent mai dilatate și mai tortuoase comparativ cu cele din țesutul normal, nu am obținut o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește indicele de tortuozitate al acestora. *Acest rezultat ar putea reflecta ideea că aspectul tortuos ar putea fi dat mai curând de deformarea mecanică derivată din creșterea întregului țesut tumoral, decât de tortuozitatea în sine a fiecărui segment vascular.* De asemenea, nu a existat o diferență semnificativă nici între raportul fiică/mamă din țesutul normal și rețeaua vasculară ramificată tumorală (parametru derivat din legea lui Murray pentru interconectarea vaselor cu calibru crescut cu cele mici, aplicată angiogenezei cancerului colorectal).

Ținând cont de faptul că una dintre strategiile tratamentului cu agenți antiangiogenetici constă în a reduce tortuozitatea vaselor anormale [19] și de faptul că eficiența chimioterapiei depinde de prezența unui aport sanguin adecvat în tumoră care să asigure distribuția eficientă a substanței respective, este de dorit “normalizarea” rețelei vasculare tumorale. Astfel, evaluarea diferențelor la nivelul lungimii vasculare, tortuozității și patternului de ramificare cu ajutorul *imunoendoscopiei* ar putea fi utilă pentru identificarea categoriilor de pacienți care ar putea beneficia de terapie angiogenetică neoadjuvantă [20].

Utilizarea în practică a acestor parametri morfometrici ca biomarkeri ar putea depinde de stadiul de dezvoltare în care se află tumora. Este necesară continuarea investigațiilor pe loturi mai mari de pacienți monitorizați pe intervale de timp mai lungi pentru a verifica dacă parametrii morfometrici sunt în strânsă asocieră cu gradul de diferențiere și stadiul adenocarcinoamelor colorectale și dacă se corelează cu răspunsul la tratament și cu prognosticul. Alte aplicații ar putea deriva din investigarea monitorizării efectelor terapiei antiangiogenetice (ex. bevacizumab) în tumori asupra ramificării vasculare, tortuozității și volumului vascular.

Sublotul 3

2.2. Evaluarea neoangiogenezei la pacienții cu cancer colorectal cu ajutorul CLE și al anticorpilor anti- CD105 marcați fluorescent- Studiu *Ex Vivo*

Scop: O întrebare importantă pentru validarea angiogenezei tumorale este ce proporție din rețeaua vasculară tumorală aparține vaselor tumorale preexistente și cât reprezintă vasele nou formate. *Endoglină (CD105)* este considerată un marker endotelial superior în evaluarea neoangiogenezei, fiind exprimată preferențial pe celulele endoteliale ale țesutului angiogenetic, spre deosebire de markerii panendoteliali. În acest scop, am evaluat neoangiogeneza în cancerul colorectal, comparând cu ajutorul CLE expresia selectivă a anticorpilor anti- CD105 marcați fluorescent la nivelul vaselor nou- formate cu expresia anticorpilor anti-CD31, având ca standard de referință examenul histopatologic.

Material și metode: S-a analizat un total de 160 de probe de țesut de la populația inclusă în studiu. Aceasta a conținut pacienți cu adenocarcinoame rectale în stadiile II-III (conform stadializării AJCC), fără tratament anterior și fără determinări secundare. Lotul inițial a inclus 12 pacienți (8 bărbați și 4 femei), selectați dintre cei internați în Clinica Medicală I- Gastroenterologie și Clinica de Chirurgie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, care au acceptat să fie incluși în studiu. Dintre aceștia, au fost excluși un pacient deoarece ecografia abdominală a evidențiat prezența metastazelor hepatice și o pacientă care fusese recent radiotratată. În timpul colonoscopiei standard, s-au recoltat biopsii de la 10 pacienți cu vârstă cuprinsă între 47–80 ani (media de vârstă 65.2 ± 9.9 ani), cu cancer rectal confirmat histopatologic, înainte de a fi supuși terapiei neoadjuvante și rezecției chirurgicale (pentru evitarea semnalului fals pozitiv în contextul inflamației sau fibrozei postradio-chimioterapie). Probele de țesut proaspăt obținute de la acești pacienți au fost pregătite imediat pentru evaluarea CLE și imunohistochimică. Programul ImageJ a fost folosit pentru a obține proiecția tridimensională Z a imaginilor confocale în serie reprezentative pentru fiecare biopsie, compactate anterior în stack-uri de câte 60- 250 de imagini. Astfel, după ce s-a realizat reconstrucția 3D, am calculat offline densitatea vasculară și diametrele vaselor incluse pe două arii de interes dreptunghiulare de $50 \times 475 \mu\text{m}$ fiecare, situate perpendicular în centrul fiecărei imagini, în direcție orizontală și verticală, asemănător studiului anterior.

Rezultate: Utilizarea anticorpilor anti-CD105 s-a dovedit adecvată pentru punerea în evidență a vaselor de sânge din tumorile maligne colorectale. În timp ce anticorpii antiCD31 au colorat în egală măsură vasele din colonul normal și din țesutul patologic, expresia vasculară a CD105 s-a remarcat în principal în leziunile maligne, fiind redusă sau absentă în vasele mucoasei normale (244.21 ± 130.7 vase/ mm^3 pentru doar patru dintre pacienți). Diametrul mediu al vaselor CD105 pozitive a fost de $10.97 \pm 0.6 \mu\text{m}$ în țesutul tumoral, iar densitatea vasculară de 2787.40 ± 134.8 vase/ mm^3 . În cazul folosirii anticorpilor anti-CD31, diametrul vascular mediu în țesutul colonic normal a fost de $7.67 \pm 0.5 \mu\text{m}$, iar densitatea vasculară de 3191.60 ± 387.8 vase/ mm^3 , în timp ce în tumoră am obținut un diametru mediu de $10.88 \pm 0.8 \mu\text{m}$ și

densitatea vasculară de 4707.30 ± 448.85 vase/mm³. Astfel, au existat mai multe vase CD31 pozitive decât CD105 pozitive ($p < 0.05$). Valoarea medie a diametrului vascular a fost asemănătoare pentru ambele colorații- CD31, respectiv CD105. O comparație calitativă între CLE versus imunohistochimie a condus la rezultate similare.

Concluzii: Acest studiu demonstrează faptul că evidențierea specifică și cuantificarea rețelei vasculare tumorale este posibilă cu ajutorul CLE și a imunomarcării cu CD105 și că această moleculă proangiogenetică reprezintă un marker mai specific pentru neoangiogeneza cancerului colorectal decât markerii panendoteliali utilizați în mod obișnuit. *Până în prezent, nu a mai fost raportat nici un studiu care să testeze fezabilitatea CLE cu CD105 marcat fluorescent la pacienții cu patologie colorectală.* Imagini confocale obținute în timp real care să dea informații despre contextul morfologic vascular pe baza anticorpilor anti-CD105 ar putea ajuta la o mai bună selecție a pacienților care să urmeze tratament țintit antiangiogenetic alături de o evaluare rapidă a efectelor terapeutice. Un număr mai mare de pacienți ar fi necesar pentru studiul corelației MVD- grad de diferențiere tumorală și stadializare, cu șanse mari ca imunoendoscopia cu CD105 să furnizeze o evaluare fiabilă a statusului angiogenetic al pacienților cu cancer colorectal.

2.3. Endomicroscopia confocală laser combinată cu anticorpi anti-CD105 marcați fluorescent pentru studiul *In Vivo* al angiogenezei cancerului colorectal

Scop: În studiul anterior, am propus utilizarea CD105 în asociere cu CLE ca metodă fiabilă pentru evaluarea în timp real a statusului angiogenetic al pacienților cu cancer colorectal. Înainte de adaptarea acestei metode pentru o eventuală monitorizare a răspunsului la terapia țintită, am ilustrat fezabilitatea utilizării *in vivo* a anticorpilor specifici endoteliali marcați fluorescent în imagistica moleculară a cancerului colorectal la subiecți umani [10].

Material și metode: Un pacient în vârstă de 65 de ani cu cancer rectal a fost recrutat din cadrul Clinicii de Chirurgie I a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, înainte de a fi supus intervenției chirurgicale. Studiul a fost condus conform Codului Internațional de Etică al Asociației Medicale Mondiale (Declarația de la Helsinki) și aprobat de Comisia locală de Etică și Deontologie Universitară și Științifică. După calibrarea CLE, tumora a fost spălată cu soluție salină (pentru a curăța aria de interes și pentru a evita diminuarea semnalului fluorescent dependent de presiunea osmotică a altor soluții). Soluția de anticorp fluorescent (1 ml de FITC-labeled anti-CD105/Endoglin antibody, Exbio, 1:5) a fost administrată topic printr-un cateter spray, după ce am exclus prezența autofluorescenței tisulare. Am alocat un interval de 10 minute pentru incubarea soluției de anticorp, apoi am analizat cu ajutorul CLE aria țintă, cu înregistrare de imagini. Am folosit instrumentul “*fractal box count*” din ImageJ pentru calcularea dimensiunii fractale a vaselor tumorale din imaginile seriate confocale convertite în stackuri

RGB. *Densitatea vasculară*, în general evaluată imunohistochimic prin estimarea ariei acoperite de vase dintr-o imagine, a fost de asemenea estimată, ca parametru non-fractal. Probele de biopsie tumorală corespondente au fost colorate imunohistochimic pentru CD105 și CD31, pentru evaluarea densității microvasculare (MVD) și a ariilor vasculare. Analiza fractală a rețelei vasculare a fost evaluată cu ajutorul metodei “*fractal box counting*” din ImageJ pe măști binarizate și scheletonizate.

Rezultate: A fost posibilă analiza clinică a unui total de 67 de imagini, de calitate bună și medie. Valoarea fractală a fost de 1.46, ca indicator al arhitecturii vasculare haotice (considerând 2 valoare fractală pentru vase normale). Densitatea vasculară tumorală a fost de 146.09 vase/mm². Nu au existat efecte adverse imunologice sau alte efecte adverse în timpul sau după aplicarea topică a anticorpilor anti-CD105 conjugați cu FITC. Evaluarea imunohistochimică a confirmat prezența vaselor vasculare prin exprimarea atât de markerul panendotelial CD31 cât și de CD105, detectând mai puține vase cu ajutorul CD105 decât cu CD31. CD31 a permis cuantificarea a 294.3 vase tumorale/mm² și a unei arii vasculare de 21.4%. Cu ajutorul CD105 au fost estimate 239.55 vase tumorale/mm² cu o arie vasculară de 5.28%. Dimensiunea fractală a fost de 1.12 pentru colorația CD105. Examenul histopatologic a evidențiat adenocarcinom moderat diferențiat (G2) cu arii mucinoase, iar stadiul postoperator al tumorii a fost T3N1M0.

Concluzii: Studiul rețelei vasculare tumorale și evidențierea structurii ei haotice a fost fezabilă cu ajutorul exprimării vasculare a CD105 în timpul CLE. *Acesta reprezintă primul studiu care utilizează CLE și anticorpi anti-CD105 in vivo pentru a evidenția vascularizația unei tumori maligne colorectale.* Calitatea imaginilor a fost influențată de câțiva factori. În acest caz, timpul scurs de la administrarea topică a anticorpilor până la examinarea CLE a fost de 10 minute. Ținând cont de faptul ca intervalul de timp propice pentru legarea anticorpilor este dependent de ținta moleculară și de calea de administrare acestora [21], sunt necesare mai multe studii *in vivo* cu diverse intervale de timp pentru standardizarea protocolului. Alți factori care ar putea influența calitatea imaginii includ plasarea necorespunzătoare a sondei CLE, cantitate insuficientă de CD105-FITC, supraexpunerea la laser, supraîncălzirea țesutului secundară expunerii la lumină laser, cu limitarea analizei amănunțite a aceleiași arii țintă pentru perioade de timp mai lungi prin efectul fototoxic indus asupra țesutului. Așadar, ținând sub control aceste situații, calitatea imaginii CLE ar putea fi îmbunătățită astfel încât să faciliteze o mai bună detecție a modificărilor patologice.

Viitoare aplicații *in vivo* ale imunoendoscopiei cu CD105 ar putea furniza o analiză mai specifică a arhitecturii microvascularizației tumorale în scopul stabilirii unui diagnostic precoce, al stratificării eficiente a pacienților și al monitorizării terapiei antiangiogenetice.

CONCLUZII FINALE

- Studiul histopatologic a demonstrat repartiția predominantă a cazurilor de adenocarcinom colorectal la pacienți cu vârste peste 50 de ani, cu predominanța netă a acestei neoplazii în rândul populației de sex masculin. În majoritatea cazurilor formațiunea tumorală a fost localizată la nivelul rectului, a predominant stadiul tumoral postoperator T3, fără determinări metastatice ganglionare sau metastaze la distanță. Cele mai multe cazuri de adenocarcinom au fost moderat diferențiate (G2).
- Markerul panendotelial CD31 folosit în mod curent pentru cuantificarea MVD nu evidențiază cu acuratețe angiogeneza tumorală. Nu am putut demonstra existența unei diferențe semnificative între pacienții care au decedat și cei care erau în viață la finalul studiului în ceea ce privește MVD pentru CD31. Am întâlnit o diferență semnificativă în ceea ce privește procentul din aria vascularizată pentru CD31 între pacienții care au prezentat semne de inflamație în momentul diagnosticului și cei care nu au prezentat.
- Determinarea angiogenezei tumorale cu ajutorul MVD-CD105 are valoare informativă independentă pentru prognosticul pacienților cu cancer colorectal și ar putea fi folositor ca biomarker pentru conturarea strategiei de terapie adjuvantă individualizată. Am identificat existența unei legături între MVD-CD105 și mortalitatea pacienților cu cancer colorectal. Aceste rezultate necesită confirmare în studii de tip prospectiv realizate pe loturi omogene de pacienți.
- Studiul imunohistochimic este limitat prin faptul că activitatea markerilor specifici pentru endoteliul activat, de tipul CD105, depinde de procesul de fixare în cazul biopsiilor incluse la parafină. O secțiune 2D obținută prin tehnici de imunohistochimie nu permite măsurarea cu acuratețe a unor parametri vasculari ca lungimea vaselor, indicele de tortuozitate sau a raportului vas fiică/vas mamă.
- Endomicroscopia confocală laser (CLE) combinată cu *markeri panendoteliali* (CD31) fluorescenți aplicată pe biopsii proapăt recoltate nefixate este compatibilă cu măsurarea mai multor parametri vasculari spre deosebire de imunohistochimia propriu-zisă. Avantajele majore ale acestei metode constă în timpul mai scurt de prelucrare și lipsa artefactelor din tehnica de fixare tisulară utilizată în imunohistochimie.
- Endomicroscopia confocală laser combinată cu *anticorpi țintiți* (CD105) folosită pentru evaluarea arhitecturii microvasculare 3D a tumorilor se pretează atât pentru măsurarea cantitativă cât și calitativă a angiogenezei. Metoda necesită validare în studii viitoare *in vivo* care să urmărească dezvoltarea morfologică tumorală în interdependență cu variațiile microvascularizației în timp.
- Am demonstrat că evidențierea specifică și cuantificarea microvascularizației tumorale este fezabilă atât *ex vivo*, cât și *in vivo* cu ajutorul examinării CLE în asociere cu imunomarcarea cu CD105 a țesutului colorectal.
- Markerii țintiți ai angiogenezei, în asociere cu examinarea CLE, pot deveni o metodă fiabilă pentru evaluarea statusului angiogenic la pacienții cu cancer colorectal.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* 2010, 60(5):277-300 [10.3322/caac.20073]
2. Simona Gurzu, Z. Szentirmay, I. Jung, Molecular classification of colorectal cancer: a dream that can become a reality, Review, *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(2):241–245
3. Walsh JM, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: scientific review. *JAMA* 2003; 289: 1288–96.
4. American Society for Gastrointestinal Endoscopy, doi:10.1016/j.gie.2009.04.002
5. Kiesslich R, Neurath MF. Endomicroscopy is born - do we still need the pathologist? *Gastrointest Endosc.* 2007;66:150-153
6. Tomizawa Y, Konda VJA (2014) Confocal Laser Endomicroscopy: The Potential Role of In Vivo Characterization of Neoplasia in the Gastrointestinal Tract. *J Clin Exp Pathol* 4:181. doi: 10.4172/2161-0681.1000181
7. Wallace M, Lauwers GY, Chen Y, Dekker E, Fockens P, Sharma P, Meining A: Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2011, 43(10):882-891 [10.1055/s-0030-1256632]
8. Singh SK, R. Arsenescu R, Bertani H, Caillol F, Carr-Locke D, The role of confocal laser endomicroscopy in the management of patients with colorectal lesions: a consensus report based on clinical evidence, *UEG Week, 2014, Abstract*
9. Ciocalteu A, Saftoiu A, Cartana T, Gruionu LG, Pirici D, Georgescu CC, Georgescu CV, Gheonea DI, Gruionu G: Evaluation of new morphometric parameters of neoangiogenesis in human colorectal cancer using confocal laser endomicroscopy (CLE) and targeted panendothelial markers. *PloS one* 2014, 9(3):e91084 [10.1371/journal.pone.0091084]
10. Ciocalteu A, Saftoiu A, Cartana T, Cherciu I, Gruionu L, Pirici D, Georgescu C, Gruionu G, Feasibility study for the evaluation of morphological pattern of neoangiogenesis in human colorectal cancer using confocal laser endomicroscopy and targeted anti- CD105 antibodies, *United European Gastroenterology Journal*; 2014:2 (Supplement 1)
11. Ciocalteu AM, Pirici D, Georgescu CV, Surlin V, Saftoiu A, Endomicroscopy with Fluorescent CD105 Antibodies for "In Vivo" Imaging of Colorectal Cancer Angiogenesis, *Current Health Sciences Journal* 2015, Volume 41, Issue 3, [DOI 10.12865/CHSJ.41.03.17]
12. Dong YY, Li YQ, Yu YB, Liu J, Li M, Luan XR: Meta-analysis of confocal laser endomicroscopy for the detection of colorectal neoplasia. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2013, 15(9):e488-495 [10.1111/codi.12329]

13. Wang KK, Carr-Locke DL, Singh SK, Neumann H, Bertani H, Use of probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) in gastrointestinal applications. A consensus report based on clinical evidence, United European Gastroenterology Journal, 2015 doi:10.1177/2050640614566066
14. Sharma MR, Schilsky RL. GI cancers in 2010: New standards and a predictive biomarker for adjuvant therapy. Nature reviews Clinical oncology 2011;8(2):70-2.
15. Moreira LR, Schenka AA, Latuf-Filho P, et al. Immunohistochemical analysis of vascular density and area in colorectal carcinoma using different markers and comparison with clinicopathologic prognostic factors. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 2011;32(3):527-34.
16. Langan RC, Mullinax JE, Raiji MT, et al. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. Journal of Cancer 2013;4(3):241-50.
17. *Ciocâlțeu Adriana, Săftoiu Adrian, Pirici Daniel, Cristea Cosmin, Georgescu Claudia- Valentina, Angiogenesis-based Prognostic Markers in Immunohistochemistry for Colorectal Cancer Patients, Medicină Internă/Internal Medicine 2015, Volume 4, In press*
18. Less JR, Posner MC, Skalak TC, Wolmark N, Jain RK. Geometric resistance and microvascular network architecture of human colorectal carcinoma. Microcirculation. 1997;4:25–33
19. Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. Nature Medicine 7: 987–989.
20. Shom Goel et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases, Physiol Rev. 2011 July; 91(3): 1071–1121.
21. Waldner MJ, Wirtz S, Neufert C, Becker C, Neurath MF: Confocal laser endomicroscopy and narrow-band imaging-aided endoscopy for in vivo imaging of colitis and colon cancer in mice. Nature protocols 2011, 6(9):1471-1481 [10.1038/nprot.2011.377]

LUCRĂRI PUBLICATE

1. **Ciocalteu A**, Saftoiu A, Cartana T, Gruionu LG, Pirici D, Georgescu CC, Georgescu CV, Gheonea DI, Gruionu G: Evaluation of new morphometric parameters of neoangiogenesis in human colorectal cancer using confocal laser endomicroscopy (CLE) and targeted panendothelial markers. *PloS one* 2014, 9(3):e91084 [[10.1371/journal.pone.0091084](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091084)]
2. **Ciocalteu AM**, Pirici D, Georgescu CV, Surlin V, Saftoiu A, Endomicroscopy with Fluorescent CD105 Antibodies for "In Vivo" Imaging of Colorectal Cancer Angiogenesis, *Current Health Sciences Journal* 2015, Volume 41, Issue 3, [[DOI 10.12865/CHSJ.41.03.17](https://doi.org/10.12865/CHSJ.41.03.17)]
3. Cartana T, Adrian Săftoiu, Lucian Gheorghe Gruionu, Dan Ionut Gheonea, Daniel Pirici, Claudia Valentina Georgescu, **Adriana Ciocâlțeu**, Gabriel Gruionu, Confocal laser endomicroscopy for the morphometric evaluation of microvessels in human colorectal cancer using targeted anti-CD31 antibodies. *PloS one* 2012;7(12):e52815.
4. **Ciocâlțeu Adriana**, Săftoiu Adrian, Pirici Daniel, Cristea Cosmin, Georgescu Claudia-Valentina, Angiogenesis-based Prognostic Markers in Immunohistochemistry for Colorectal Cancer Patients, *Medicină Internă/Internal Medicine* 2015, Volume 4, In press
5. **Adriana Ciocâlțeu**, Adrian Săftoiu, Daniel Pirici, Claudia-Valentina Georgescu, Tatiana Cârțână, Dan Ionuț Gheonea, Lucian Gheorghe Gruionu, Cosmin Gabriel Cristea, Gabriel Gruionu, Tumor Neoangiogenesis Detection by Confocal Laser Endomicroscopy and Anti-CD105 Antibody: Pilot Study, *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2015, In press