

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

**FACTORI DE INFLUENȚA ASUPRA DURATEI
DE SUPRAVIETUIRE ÎN CANCERUL
COLORECTAL**

- *rezumat* -

**CONDUCATOR DOCTORAT
PROF. UNIV. DR. CIUREA TUDOREL**

**STUDENT DOCTORAND
DELIU IONELA CRISTINA**

**CRAIOVA
2015**

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOASTERII

1. CANCERUL COLORECTAL

- 1.1 Epidemiologia cancerului colorectal*
- 1.2 Etiopatogenia cancerului colorectal*
- 1.3 Morfopatologia cancerului colorectal*
- 1.4 Stadializarea cancerului colorectal*
- 1.5 Diagnosticul cancerului colorectal*
- 1.6 Evolutie si complicatii in cancerul colorectal*
- 1.7 Factori de prognostic in cancerul colorectal*
- 1.8 Optiuni terapeutice in cancerul colorectal*

2. ANGIOGENAZA TUMORALA

- 2.1 Ipoteze asupra dependentei cresterii tumorale de angiogeneza*
- 2.2 Matricea extracelulara si angiogeneza tumorală*
- 2.3 Tipuri de angiogeneza*
- 2.4 Angiogeneza in procesul neoplazic*
- 2.5 Relatiile angiogenezei cu procesul de metastazare*
- 2.6 Markerii angiogenici*

CONTRIBUTII PROPRII

- 1. Obiectivele studiului*
- 2. Studiul clinic si histologic al carcinoamelor colorectale*
- 3. Studiul imunohistochimic al carcinoamelor colorectale*
- 4. Rezultatele studiului histologic corelat cu supravietuirea*

CONCLUZII FINALE

BIBLIOGRAFIE

CUVINTE CHEIE

cancer colorectal, angiogeneza, imunohistochimie, markerii celulari

STADIUL CUNOASTERII

Cancerul colorectal

Cancerul colorectal (CCR) reprezinta la nivel mondial 15% din totalul neoplaziilor, fiind a treia cauza de cancer la barbati (10% din total) si a doua cauza de cancer la femei, dupa cancerul mamar (9,4% din total) [1].

In Romania conform datelor estimate de Globocan pentru anul 2008, cancerul colorectal reprezinta a doua cauza de morbiditate prin cancer, atat la barbati (dupa cancerul pulmonar) cat si la femei (dupa cancerul de san).]. In ultimele doua decade, incidenta cancerului colorectal a crescut de la 13,5/100.000locuitori/an, situand Romania in randul tarilor cu un risc intermediar [9].

Extinderea și aprofundarea studiilor de genetică și medicină moleculară, dezvoltarea studiului markerilor de oncogeneză, studierea aspectelor legate de diferențele ontogenetice de ordin embriologic, histologic, histochimic și imunochimic au adus noi clarificări în oncogeneza CCR. Argumente de ordin epidemiologic, histologic și experimental atestă faptul că CCR apare ca un efect cumulativ al unor multiple modificări genetice secvențiale, responsabile de tranziția histologică de la mucoasă normală, la adenom și în final la adenocarcinom.

În funcție de valoarea lor prognostică și predictivă, factori de prognostic au fost sistematizați de către College of American Pathologists (Colegiul American al Medicilor Anatomopatologi) în patru categorii [61]:

- Categoria I: cu valoare certă și demonstrată; utilizați în managementul clinic al cazului
- Categoria IIA: necesită validare statistică prin studii solide, deși există numeroase dovezi pentru valoarea prognostică; ar putea fi utilizați în managementul clinic al cazului
- Categoria IIB: date promițătoare, dar nu suficiente pentru utilitatea lor clinică
- Categoria III: valoare nedeterminată
- Categoria IV: bine studiați, dar fără nicio valoare prognostică

Profilaxia primară se referă în primul rând la identificarea grupelor de risc și monitorizarea diferențiată a acestora. Se impune o conduită terapeutică adecvată a acestor stări premaligne (polipectomie endoscopică, colectomie profilactică în PAF, tratamentul specific al bolilor inflamatorii intestinale) [26].

Angiogeneza tumorală

Angiogeneza reprezintă formarea de noi vase pornind de la vasele existente și joacă un rol important atât în aportul de substanțe nutritive și factori de creștere cât și ca un mijloc de diseminare pentru celule tumorale. Procesul se desfășoară atât în timpul embriogenezei cât și în remodelarea vasculară în perioada postnatală.

Din datele obținute s-a emis ipoteza conform căreia: „o dată ce procesul tumoral a fost inițiat, orice creștere ulterioară a populației celulare tumorale trebuie precedată și de o creștere a neovascularizatiei care va înconjura țesutul tumoral” [126]. Conform acestui concept, o mică zonă de celule tumorale nu poate crește fără a fi indus procesul de angiogeneza.

Dezvoltarea vaselor de sânge la nivel tumoral diferă semnificativ de angiogeneza fiziologică.

Vascularizație Normală	Vascularizație Tumorală
<ul style="list-style-type: none">• bine diferențiată• uniform distribuită• structurată• flux sanguin constant, unidirecțional• permeabilitate normală, nemodificată• celule endoteliale inactive, mitotic• membrana bazală continuă	<ul style="list-style-type: none">• nediferențiată• inegal distribuită• nestructurată• flux sanguin inconstant• permeabilitate crescută• celule endoteliale active mitotic• membrana bazală discontinuă

Tabel 1. Comparatie Vascularizație Normală vs. Vascularizație Tumorală

CONTRIBUȚII PERSONALE

OBIECTIVELE CERCETĂRII

Tema de cercetare aleasă este de mare actualitate deoarece explorează tehnici de diagnostic histologic de ultimă oră pentru cancerul colorectal, bazându-se în special pe evaluarea anatomopatologică și imunohistochimică a materialului biologic cu ajutorul morfometriei asistate de calculator cu aplicarea unor tehnici morfometrice de avangardă la nivel mondial.

Existența în cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie și a Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova a infrastructurii de cercetare de înaltă tehnologie precum și a personalului calificat au creat premisele îndeplinirii cu succes a următoarelor obiective:

1. Realizarea unui studiu clinico-statistic prospectiv pe o durată de trei ani, prin care să identificăm principalele caracteristici ale unui lot reprezentativ de pacienți diagnosticați cu formațiuni maligne la nivelul colonului și rectului.
2. Studiul parametrilor morfologici: forma histopatologică, grad de diferențiere, invazie vasculară și perineurală, afectare ganglionară, prezența sau absența metastazelor la distanță, stadiul tumoral. Stabilirea corelațiilor semnificative statistic între parametrii clinici și morfologici investigați.
3. Fenomenul de angiogeneză în cancerul colorectal prin analiză imunohistochimică, morfometrică și imagine computerizată. Corelarea densității microvasculare cu diverși parametrii clinici și morfopatologici precum forma histopatologică, grad de diferențiere, afectarea ganglionară, prezența sau absența metastazelor la distanță și stadiul tumoral.
4. Rezultatele studiului histologic corelat cu supraviețuirea.

STUDIUL CLINIC ȘI HISTOLOGIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE

Material și metode

În acest studiu prospectiv desfășurat în perioada octombrie 2012 - iulie 2015 au fost incluși pacienți diagnosticați cu tumoră malignă la nivelul unuia din segmentele colonului și rectului. Pacienții au fost selectați dintre cei internați în Clinica Medicală I - Gastroenterologie Spitalului Județean Universitar de Urgențe Craiova, cât și dintre pacienții care s-au prezentat în ambulatoriul Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie (CCGH) Craiova, Universitatea de Medicină și Farmacie (UMF) Craiova. Studiul histologic și imunohistochimic a fost efectuat în cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie (CSMMI) din cadrul UMF Craiova.

Lotul de studiu a cuprins un număr de 118 pacienți diagnosticați cu neoplasm colorectal, cărora le-au fost recoltate fragmente de țesut tumoral fie prin colonoscopie cu biopsie (75 pacienți), fie din piesa de rezecție chirurgicală, acolo unde a fost posibil (43 pacienți). Atunci când au existat ambele, am preferat piesa de rezecție chirurgicală în detrimentul piesei obținute prin biopsie endoscopică directă.

Toți pacienții incluși au îndeplinit criteriile de includere specifice și au primit toate informațiile despre natura studiului și protecția datelor personale înainte de semnarea consimțământului.

Prelucrarea secundară a datelor – analiza descriptivă a lotului în funcție de diferiți parametri, calcularea parametrilor statistici fundamentali, media și deviația standard, a raportului lor, numit coeficient de variație, reprezentarea lor grafică și calculul coeficientului de regresie - a fost efectuată cu programul Excel, cu ajutorul comenzilor Pivot Tables, Functions-Statistical, Chart și a modului Data Analysis.

Rezultate

Majoritatea cazurilor cu patologia studiată se regăsesc în decadele de vârstă 60-69 de ani (aproape 40%), respectiv 70-79 de ani (peste 30%), mai puțin de un sfert dintre pacienți având vârste sub 60 de ani.

Din totalul de pacienți aparținând lotului studiat, 80 de cazuri au fost bărbați, iar 38 de cazuri au fost femei, evidențiindu-se astfel o mai mare incidență a bolii la sexul masculin.

Deoarece populația la nivelul județului Dolj locuiește în proporție de 46,87% în mediul rural și 53,13% în mediul urban, putem considera că nu există o diferență semnificativă în ceea ce privește mediul de rezidență între structura lotului de studiu și cea a populației din județ (p test z pentru proporții = 0,545 > 0,05).

Doar pentru localizarea tumorilor (colon drept, colon stâng și rect) am identificat trei rezultate semnificative statistice - în ceea ce privește nr. de trombocite ($p=0,023$), nr. de leucocite (0.007) și procentul de neutrofile segmentate (0.002). Comparând valorile acestor parametri, prin testul ANOVA, am identificat o diferență semnificativă între cele trei categorii de pacienți, grupate în funcție de localizarea tumorilor. Continuând analiza prin testul post-hoc Fisher LSD, a reieșit că diferențele se manifestă doar între cazurile cu tumori de colon drept și cele cu tumori de rect, pentru toți cei trei parametri enumerați anterior.

STUDIUL ÎMUNOHISTOCHEMIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE

Material si metode

Materialul histopatologic utilizat și pentru studiile de imunohistochimie a fost procesat în cadrul CSMMI din cadrul UMF Craiova. Studiul imunohistochimic a fost efectuat pe un lot de 65 pacienți inclus în studiul histopatologic. Au fost folosite probe rezultate din biopsiile endoscopice recoltate în cadrul Clinicii Gastroenterologie sau Medicină Internă ale SCJUC Craiova sau în cadrul CCGH Craiova, cât și probe obținute din piesele de rezecție chirurgicală obținute din cadrul secțiilor de Chirurgie ale SCJUC Craiova.

Pentru imunolocalizarea vaselor de sange, secțiunile de țesut fixate la parafina au fost supuse la imunocolorarea pentru CD31, CD34 și CD105. După deparafinare, activitatea peroxidazei endogene a fost blocată prin incubare cu peroxid de hidrogen 0,3% în metanol timp de 30 min. Apoi secțiunile au fost incubate cu anticorpii corespunzători în PBS cu un conținut de 1% BSA pentru 16 ore la 4⁰ C. Anticorpii au fost detectați cu ajutorul diaminobenzidinei (DAB), ca substrat, și secțiunile au fost contracolorate cu hematoxilina Mayer 's.

Rezultate

Analiza statistică efectuată în cadrul studiului imunohistochimic a relevat că există diferențe semnificativ statistice pentru anticorpii CD105 ($p = 0,046 < 0,05$), ceea ce rezultă, ca acest anticorp este un instrument valoros pentru evaluarea gradului în cancerul colorectal.

Diferențele pentru anticorpii CD31 în funcție de gradul tumoral nu sunt foarte mari; chiar dacă valorile CD31 sunt ușor mai scăzute pentru G1 decât pentru G2, și mai mici pentru G2 față de G3, variabilitatea observată pentru măsurători face această comparație irelevantă ($p \text{ ANOVA} = 0,964 > 0,05$).

Timpul Quick scade odată cu creșterea stadiului pT, diferențele observate fiind aproape de pragul de semnificație statistică. Totuși, rezultatul testului ANOVA nu ne permite să afirmăm că diferențele se pot generaliza și nu sunt doar un rezultat particular, valabil doar pentru lotul studiat, $p = 0,061 > 0,05$.

Există o diferență înalt semnificativă, între pacienții cu stadiul T diferit, în ceea ce privește valoarea : hemoglobinei ($p \text{ ANOVA} < 0,001$), hematocritului (p

ANOVA<0,001), VEM (p ANOVA<0,001), HEM (p ANOVA=0,002<0,01 - diferența semnificativă, cu încredere de 99%).

Nici între relația dintre anticorpii CD34 și CD 105 nu există o corelație semnificativă statistic, deși valoarea coeficientului de corelație Pearson este mai mare ($r = 0,130$), dar nu suficientă pentru ca valoarea p să ajungă sub pragul maxim admis, care indică semnificație statistică ($p = 367 > 0,05$).

Calculând coeficientului de corelație Pearson pentru relația CD31-CD105 am obținut o valoare $r = 0,440$, ceea ce corespunde unei valori $p = 0,0013 < 0,05$, indicând o corelație direct semnificativă statistic între cei doi factori. În concluzie, putem spune că CD 31 crește în paralel cu CD 105 pentru cazurile analizate în acest studiu.

REZULTATELE STUDIULUI HISTOLOGIC CORELAT CU SUPRAVIETUIREA

Datorită caracterului prospectiv și intervalului scurt pe care s-a întins studiul, evaluarea supraviețuirii s-a efectuat doar până la 36 de luni de la diagnosticare.

Din cele 118 cazuri luate în studiu, 65 de cazuri se mai aflau în viață la terminarea perioadei de studiu.

Analiza curbelor de estimare a supraviețuirii la 1 an în funcție de localizare a evidențiat că tumorile de colon ascendent au un prognostic mai prost decât cele de colon descendent, ambele localizări au o supraviețuire mai slabă decât cele de rect ($p=0,045 < 0,05$).

Analiza corelației supraviețuirii la 2 ani în funcție de localizare a evidențiat că tumorile de colon au o supraviețuire comparabilă la 2 ani, și mai slabă decât cele de rect, însă fără să mai existe semnificație statistică ($p=0,099 > 0,05$); iar la 3 ani nu mai există diferențe semnificative în ceea ce privește supraviețuirea ($p=0,291 > 0,05$).

Analiza corelației supraviețuirii cu tipurile histopatologice de cancer a evidențiat că nu există diferențe semnificative între adenocarcinom și carcinom mucinos :

- supraviețuire la 1 an : $p=0,270 > 0,05$
- supraviețuire la 2 ani : $p=0,363 > 0,05$
- supraviețuire la 3 ani : $p=0,338 > 0,05$

Ulterior clasificării pe tipuri histopatologice s-a aplicat și sistemul de clasificare în funcție de gradul de diferențiere.

Marea majoritate a cazurilor s-au încadrat în categoria neoplasmelor moderat diferențiate, cu aproape jumătate din cazuri (49,15%). Aspectul slab diferențiat a fost al doilea ca frecvență, acoperind un procent de 40,68%.

Analiza curbelor Kaplan Meier de estimare a supraviețuirii în funcție de gradul de extensie al tumorilor în profunzimea peretului colorectal a confirmat ca T4 prezintă o supraviețuire mai slabă decât T2 sau T3, rezultatul testului Wilcoxon este aproape de limita de semnificație statistică ($p=0,052>0,05$) la 1 an. De asemenea la 2 ani T4 prezintă o supraviețuire semnificativ mai slabă decât T2 sau T3 ($p=0,035$), dar crește diferența dintre T2 și T3, fără semnificație statistică, iar la 3 ani există diferențe semnificative statistic între T4 și T3, respectiv între T3 și T2 ($p=0,028<0,05$).

Analiza curbelor Kaplan Meier de estimare a supraviețuirii la 1 an în funcție de gradul de invazie ganglionară a identificat că nu există diferențe semnificative în funcție de stadiul N ($p=0,889>0,05$), iar la 2 ani apar diferențe, însă nu sunt semnificative statistic ($p=0,711>0,05$).

Cum era de așteptat analiza corelației supraviețuirii cu prezența determinărilor tumorale secundare a confirmat că după doi ani de la follow up supraviețuirea pacienților fără metastaze este semnificativ mai mare decât a celor cu determinări tumorale secundare ($p=0,048<0,05$), iar la 3 ani cei fără metastaze au o supraviețuire superioară față de cei cu metastaze, diferența este semnificativă statistic ($p=0,046<0,05$).

CONCLUZII

- Cancerul colorectal este al treilea cancer ca frecvență la bărbați (reprezentând 10,0% din totalul neoplaziilor) și al doilea la femei (reprezentând 9,4% din totalul neoplaziilor) la nivel mondial.

- Actualitatea cercetărilor în domeniul cancerului colorectal este impusă de creșterea continuă a incidenței bolii atât în țările dezvoltate, care înregistrează deja nivele ridicate de prevalență, cât și în țări în care cancerul colorectal nu realizează încă rate îngrijorătoare.

- Cancerul colorectal a fost mai frecvent la sexul masculin, 80 de pacienți din cei 118 investigați fiind de sex masculin.

- Tumorile incluse în studiu au fost extrem de agresive, doar 65 de cazuri se mai aflau în viață la terminarea perioadei de studiu iar 58,47 % din decesele înregistrate au fost în primul an al studiului.

- Nu au existat diferențe semnificative de supraviețuire între sexe la nivelul grupului studiat.

- Rectul a fost cel mai afectat cu 47,46% din cazuri, urmat în ordinea frecvenței de colonul drept și colonul stâng.

- Majoritatea cazurilor cu patologia studiată se regăsesc în decadele de vârstă 60-69 de ani (aproape 40%), respectiv 70-79 de ani (peste 30%), mai puțin de un sfert dintre pacienți care au vârste sub 60 de ani.

- Nu există diferență semnificativă statistic între urban și rural în ceea ce privește repartitia pe sexe, peste 2/3 din pacienți sunt de sex bărbătesc.

- Din punct de vedere histopatologic 88,14% din neoplazmele colorectale au fost adenocarcinoame și 11,86% carcinoame epidermoide neexistând diferențe semnificativ statistic din punct de vedere al supraviețuirii.

- 44,07% din pacienții investigați au prezentat localizări tumorale la distanță și au prezentat o durată medie de supraviețuire mai mică (în medie 19 luni).

- La baza tumorii și la frontul de invazie numărul de vase marcate cu anticorpii CD31 (vase mature) este mai mare decât numărul de vase marcate cu anticorpii CD105 (vase de neoformare), iar în masa tumorală raportul este inversat.

- Analizând rezultatele globale, am găsit valorile markerului CD4 să fie aproape duble, comparativ cu CD31 sau CD105, valorile medii pentru CD31 sunt semnificativ statistic mai mari decât valorile CD105.

- Valorile medii ale anticorpului CD34 pentru cazurile moderat diferențiate sunt mai mici decât pentru cazurile bine diferențiate, ceea ce este oarecum neașteptat, și mai mici decât pentru slab diferențiate, niciuna dintre diferențe nu au fost totuși semnificativ statistic.

- Pacienții cu stadiul pT4 par să aibă un număr semnificativ mai mare de trombocite și neutrofile segmentate decât cei din stadiile pT2 și pT3.

- Densitatea microvasculară identificată de anticorpii CD31 crește în paralel cu densitatea microvasculară identificată de anticorpii CD105 pentru cazurile analizate în acest studiu.

- Un număr important de vase de neoformare (~ 40%) au fost găsite în zona tumorii, ceea ce este o observație importantă pentru alegerea tratamentului corect și eficient în cancerul colorectal.

Bibliografie selectiva

1. World Health Organization. Ten Statistical highlights in global public health. World Health Statistics, 2007. Geneva : World Health Organization.
2. Center MM, Jemal A, Ward EM. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009 ; 18(16) :168-94.
3. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, Fric, P. Colorectal cancer screening in Europe. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15:5907-5915.
4. Ordinul MSP nr. 2027/26.11.2007 publicat în MO nr. 822, 3 decembrie 2007.
5. Boyle P, Ferlay J. Mortality and survival in breast and colorectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005; 2(9):424-425.
6. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors *Clin Colon Rectal Surg.* 2009 November; 22(4): 191-197.
7. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996; 87:159-170.
8. Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer*, 1995; 75:154-170.
9. Rabeneck L, Davila JA, El-Serag HB. Is there a true "shift" to the right colon in the incidence of colorectal cancer? *Am J Gastroenterol.* 2003; 98:1400..
10. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 2012; 3:153-73.
11. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet*, 1999; 353:391-399.
12. Compton C. C. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*, 2003; 16 (4):376-388.
13. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*, 2005; 48:1161.