

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA**

**TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT**

**CARCINOAME COLORECTALE CU PRODUCȚIE
EXCESIVĂ DE MUCINĂ.
STUDIU CLINICO-PATOLOGIC ȘI
IMUNOHISTOCHIMIC**

Conducător Științific:

PROF. UNIV. DR. SIMIONESCU CRISTIANA

Doctorand:

GRUIA CORINA-LAVINIA

CRAIOVA 2013

CUPRINS TEZĂ

INTRODUCERE	4
PARTEA GENERALĂ – STADIUL CUNOAȘTERII	
CAPITOLUL I: Etiologia și epidemiologia carcinoamelor colorectale	7
I.A Etiologia carcinoamelor colorectale	7
I.B Epidemiologia carcinoamelor colorectale	21
CAPITOLUL II: Carcinogeneza colică	26
II.A Bazele genetice ale carcinogenezei colorectale	26
II.A.1 Mecanisme genetice ale carcinogenezei colorectale	27
II.A.2 Aspecte morfologice ale carcinogenezei colorectale	34
CAPITOLUL III: Sisteme de clasificare ale carcinoamelor colorectale	43
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	51
PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL IV. Material și Metode	53
IV.A. Materialul studiat	53
IV.B. Metode utilizate	55
CAPITOLUL V: Rezultate	62
V.A.Studiul histopatologic al carcinoamelor colorectale cu exces de mucină	62
V.A.1Parametrii clinici ai carcinoamelor colorectale cu exces de mucină	64
V.A.2Parametrii histopatologici	66
V.A.2.1 Leziuni pretumorale asociate	71
V.A.2.2 Displazia mucoasei colice	74
V.A.2.3 Malignități primare multiple la nivel colorectal	77
V.A.3 Parametrii histopatologici cu valoare prognostică	77
V.A.3.1 Invazia vasculară	78
V.A.3.2 Invazia perineurală	80
V.A.3.3 Implanturile tumorale	80
V.A.3.4 Marginile de rezecție în sens longitudinal și circumferențial	81
V.A.4 Parametrii stadializării clinico-patologice	81

V.A.4.1 Progresia tumorală și diseminarea pericorectală (Stadiul pT)	81
V.A.4.2 Status-ul ganglionilor limfatici locoregionali (Stadiul pN)	86
V.A.4.3 Metastaze în situs-uri anatomice la distanță (Stadiul pM)	89
V.A.5 Stadializarea clinico-patologică	90
V.B.Studiul imunohistochimic	93
V.B.1 Markerii de diferențiere epitelială	93
V.B.2 Markerii adresați proliferării celulare	112
V.B.3 Markerii adresați apoptozei celulare	116
V.B.4 Markerii implicați în angiogeneza tumorală	119
V.B.5 Markerii implicați în degradarea matrixului extracelular	122
V.B.6 Markerii implicați în supravegherea imunologică tumorală	125
V.B.7 Markerii pentru evidențierea budding-ului tumoral	128
CAPITOLUL VI: Discuții	133
VI.A. Studiul histopatologic al carcinoamelor colorectale cu exces de mucus	133
VI.B.Studiul imunohistochimic al carcinoamelor colorectale cu exces de mucus	148
CAPITOLUL VII: Concluzii	171
BIBLIOGRAFIE	179

CUVINTE CHEIE: carcinom colorectal, carcinom mucinos, carcinom cu celulă în „inel cu pecete”, secvența adenom-adenocarcinom, adenom, stadializare, factori prognostici, metastaze, imunohistochimie, budding.

INTRODUCERE

Carcinoamele cu dezvoltare colorectală reprezintă cea mai frecventă localizare a tumorilor maligne epiteliale din sfera digestivă, furnizând totodată a patra cauză de deces prin cancer la nivel mondial. Producția de mucină este un aspect histologic relativ frecvent întâlnit al carcinoamelor colorectale, iar când aceasta devine abundentă realizează entități histopatologice distincte, încadrate conform AJCC în subtipul mucinos (coloid) al adenocarcinoamelor și în subtipul cu celulă în „inel cu pecete”. Carcinoamele colorectale cu producție excesivă de mucină au o patogeneză complexă, multistadială, debutând la nivelul mucoasei normale colorectale, prin secvența clasică adenom-adenocarcinom. În acest proces evolutiv intervin o multitudine de factori, unii care țin de terenul pacientului: adenoamele, polipoza familială, boala inflamatorie idiopatică (IBD), displazia mucoasei colice, alți factori fiind externi, legați de expunerea la noxe, lipsa de activitate fizică, dieta (cu rol de modificare a florei intestinale și a potențialului carcinogenetic).

Cu toate că ereditatea are un rol important, în geneza cancerului colorectal intervin multiple alterări genetice somatice, atât ale genelor supresoare tumoral cât și ale genelor implicate în stabilitatea celulară. Aceste alterări genetice își găsesc corespondent în modificări la nivelul anumitor antigene evidențiate imunohistochimic: mucinele, factorii de creștere (ex: factori de creștere ai vascularizației tumorale VEGF), genele supresoare tumoral (ex: p53), în „dediferențierea” la nivelul frontului de invazie tumoral (fenomenul de budding), în expresia mecanismului imunologic de supraveghere tumorală (CD8).

Scopul lucrării este aprofundarea cunoașterii, atât din punct de vedere al etiopatogeniei carcinoamelor colorectale cu exces de producție de mucină, a aspectelor histopatologice care le individualizează față de alte carcinoame colorectale, cu accent pe valoarea prognostică, cât și pe trăsăturile imunohistochimice cu valoare predictivă.

OBIECTIVE

Realizarea acestui studiu retrospectiv asupra unui lot de 82 pacienți cu diagnosticul de carcinom colorectal cu producție excesivă de mucină, a presupus atingerea următoarelor **obiective**:

- Mărirea ariei de cunoaștere a trăsăturilor histopatologice și imunohistochimice ale carcinoamelor colorectale cu exces de mucină, raportate la fenotipul tumoral, în vederea aprofundării mecanismelor carcinogenetice.
- Identificarea parametrilor morfologici și a leziunilor precursoare, în vederea depistării cât mai precoce și identificarea posibilelor ținte moleculare.
- Completarea parametrilor morfologici de evaluare a diagnosticului.
- Identificarea mecanismelor și a markerilor implicați în invazia și agresivitatea cancerelor colorectale secretante de mucină în exces.
- Identificarea celor mai specifici markeri ai prognosticului și potențialului metastazant al acestor cancere.
- Realizarea de corelații statistice semnificative cu scopul relevării factorilor cu valoare prognostică

MATERIAL ȘI METODE

Materialul studiat a fost prelevat de la un număr de 82 pacienți având diagnosticul de carcinoma colorectal cu exces de mucină, stabilit în urma tratamentului chirurgical, realizat în Clinicile Spitalului Județean de Urgență Craiova, într-un interval de timp cuprins între ianuarie 2008 – decembrie 2011. Numărul cazurilor cu acest diagnostic a prezentat un trend ascendant, cel mai mic număr de cazuri fiind în anul 2008 (16 rezecții chirurgicale), iar cel mai mare în anul 2010 (26 cazuri).

Metodele de lucru, descrise pe larg în teză, au urmărit analiza cazurilor luate în studiu, pentru evaluarea unor parametrii clinico-epidemiologici, morfologici, a leziunilor preneoplazice, precum și posibilele corelații între aceștia cu parametrii histopatologici și moleculari investigați. Prin studiul imunohistochimic al carcinoamelor colorectale secretante de mucină în exces, am urmărit aprecierea agresivității tumorale, evaluând expresia: 1) markerilor pentru evidențierea diferențierii epiteliale (MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2) și a imunoprofilului MUC1/MUC2 și CK7/CK20; 2) markerilor de

proliferare (Ki-67) și de apoptoză (p53); 3) markerilor adresați angiogenezei tumorale (VEGF); 4) markerilor de evidențiere a mecanismului imunologic cu rol de supraveghere a proliferării tumorale (CD8); 5) markerilor pentru evidențierea stromei tumorale (MMP9); 6) markeri pentru evaluarea budding-ului tumoral (AE1/AE3). Analiza morfometrică am utilizat-o pentru cuantificarea densității focarelor de „budding tumoral”, în vederea orientării asupra capacității invazive locale și de prognostic a carcinoamelor colorectale ce au compus lotul studiat. Analiza statistică a datelor a urmărit evaluarea corelațiilor între parametrii clinico-patologici și imunohistochimici prin calcularea unor coeficienți de corelație (p).

REZULTATE

Studiul histopatologic al cazurilor s-a realizat în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova, iar cel imunohistochimic și în cadrul Disciplinei de Morfopatologie a UMF Craiova.

Cazurile având diagnosticul stabilit de adenocarcinom colorectal cu secreție excesivă de mucină au provenit de la pacienți a căror vârstă a fost cuprinsă într-un interval având limitele între decadele a III-a și a VIII-a de viață, cele mai multe cazuri aparținând decadei a VII-a (34 cazuri). S-a remarcat ponderea cazurilor reprezentată de pacienții de sex masculin (58,53% din totalul adenocarcinoamelor mucinoase). Raportat la principalele 3 situsuri anatomice stabilite arbitrar, localizarea cancerelor colorectale cu producție în exces de mucină, a evidențiat numărul preponderent al cazurilor (40 cazuri-48,78% din total) localizate la nivelul colonului drept, față de celelalte două grupe anatomice de localizare. Prezența la nivel colorectal a unor leziuni considerate cu risc, a putut fi identificată prin studiul adenoamelor asociate (25 cazuri, procentual 30,48%) cât și a adenoamelor incluse în periferia tumorii -adenoame reziduale-(20 cazuri, procentual 24,39%).

Displazia de grad scăzut și cea de grad înalt a fost prezentă la nivelul majorității adenoamelor asociate adenocarcinoamelor mucinoase - 19 cazuri (76% din totalul adenoamelor asociate acestui tip de cancer) și la toate adenoamele reziduale evidențiate- 20 cazuri(100% din această grupă de studiu). Patternul de creștere vilos și cel tubulo-vilos au furnizat procentul cel mai mare de leziuni displazice de grad scăzut și de grad înalt, atât în cadrul adenoamelor asociate (8 cazuri reprezentând 32% din adenoame asociate carcinomului mucinos) cât și la tipul de adenom rezidual (toate cele 20 cazuri din această

categorie). Mărimea adenomului a fost de asemenea un factor de risc important în apariția displaziei, existând numeric și procentual un risc mai mare de displazie la adenoamele cu diametrul mai mare de 1cm. Invazia vasculară a fost un parametru prognostic mai frecvent întâlnit la adenocarcinoamele nonmucinoase (18,07%) față de cele mucinoase (10,97%) și totodată, pentru tumorile cu producție excesivă de mucină, mai frecventă la tumorile cu histologie în “inel cu pecete”(14,28%) față de cele mucinoase cu secreție extracelulară(10,66%).

Invazia perineurală a fost prezentă atât în 8% (6 cazuri) din adenocarcinoamele coloide cât și în 28% (2 cazuri) din carcinoamele cu “inel cu pecete” ce au compus lotul studiat.

Cea mai mare parte (65 adenocarcinoame cu secreție în exces de mucină) a lotului studiat, au fost cazuri care, la momentul intervenției chirurgicale, au interesat în totalitate peretele intestinal, fiind încadrate în categoria pT3 a stadializării tumorale (79,26% din totalul cazuisticii).

Absența metastazelor carcinomatoase în ganglionii limfatici locoregionali (stadiul pN0) a fost constatată în 37 de cazuri dintre cele 75 carcinoame mucinoase cu secreție extracelulară (49,33%) constituind categoria cea mai numeroasă a acestui tip de adenocarcinom. Stadiul pN1a și pN1b a fost reprezentat numai de adenocarcinoamele coloide din lotul studiat: 6 cazuri pN1a (8% dintre adenocarcinoamele coloide) și 9 cazuri de adenocarcinoame coloide pN1b (12%). Stadiul pN2a a fost întâlnit atât la adenocarcinoamele coloide (6 cazuri, 8%) cât și la cele cu secreție de tip “inel cu pecete”(1 caz, 14,28%). Interesarea limfoganglionară extensivă (pN2b) a fost prezentă la ambele tipuri histologice de carcinom cu secreție mucinoasă.

Imunohistochimic, din totalul celor 82 cazuri, imunomarcajul MUC1 a fost pozitiv în 70 cazuri (85,3%), MUC2 în 85,3%, iar fenotipul MUC2+/MUC1+ a fost cel mai bine reprezentat numeric (69 carcinoame, 84,14%). Acest fenotip a fost cu precădere semnalat la tumorile studiate având metastaze ganglionare și la distanță, evidențiind potențialul metastazant al acestora. Imunoexpresia MUC5AC a fost evidențiată în 23 cazuri (28% din lotul studiat). Analiza expresiei CDX2 în cele 82 carcinoame colorectale cu secreție excesivă de mucină , a relevat prezența imunomarcajului, în 69 de cazuri de tumori mucinoase (84,14%), iar imunoprofilul CK20+/CK7- a fost cel mai frecvent întâlnit dintre cele 4 variante de imunofixare. Acești markeri de diferențiere epitelială au conturat imunoprofilul carcinoamelor colorectale studiate. Carcinoamele colorectale (mai ales de tip coloid) au fost mai frecvent tumori cu activitate proliferativă moderată (IP++). În

lotul studiat, supraexpresia p53 a fost redată de 14 /82 cazuri (17,07%), iar imunomarcajul VEGF a fost exprimat în 51 de cazuri (procentual 62,19%). MMP-9 a fost exprimat cu intensitate variabilă în 60 de cazuri (73,17%) din totalul cazurilor luate în studiu, iar în 72 de cazuri (87,80%) a fost obținută o imunoexpresie CD8 pozitivă. Analiza budding-ului tumoral prin folosirea imunomarcajului pan-citokeratinelor AE1/AE3 a pus în evidență existența acestui mecanism într-un număr total de 52 cazuri (63,41%).

DISCUȚII

Din studiul nostru a reieșit că histologia mucinoasă a carcinomului colorectal nu pare să aibă o implicație epidemiologică diferită asupra vârstei pacienților față de formele nonmucinoase de cancer colorectal, astfel că, în lotul cercetat, vârsta pacienților cu maximă afectare fiind peste 70 de ani, a fost apropiată de decada a VII-a, consemnată ca maxim de incidență (pentru cancerul colorectal) în literatura de specialitate. Am remarcat o dominanță la nivelul colonului drept a cazurilor de carcinom cu secreție de mucină excesivă întâlnite la sexul feminin, în schimb, frecvența a fost în favoarea sexului masculin atât la nivelul colonului stâng, cât și la nivelul rectului. Această schimbare a distribuției sexului, este consemnată în majoritatea studiilor. De remarcat distribuția aleatorie pe întreg cadrul colic, uneori foarte aproape de tumoră, alteori la mare distanță de aceasta precum și un număr variabil al polipilor adenomatoși diagnosticați concomitent cu adenocarcinomul mucinos colorectal. Concluzia exprimată de studiul nostru, ca de altfel și de majoritatea lucrărilor de specialitate, este faptul că adenoamele reprezintă cele mai frecvente leziuni preneoplazice de la nivelul colonului, totodată, peste 95% dintre carcinoamele colorectale dezvoltându-se la nivelul unui adenom. Am remarcat existența unui procent mai mare de cazuri de adenocarcinoame nonmucinoase la care a fost pus în evidență invazia vasculară, față de tumorile mucinoase colorectale. Invazia perineurală a fost evidențiată și în studiul nostru, existând studii care subliniază că o asociere a invaziei perineurale cu invazia vasculară agravează prognosticul. Am putut remarca invazivitatea crescută a carcinoamelor colorectale cu producție excesivă de mucină studiate, majoritatea cazurilor fiind în momentul diagnosticării ca tumori pT3 și pT4.

Dezvoltarea carcinomului colorectal asociază frecvent alterări calitative și cantitative ale expresiei mucinelor. Astfel pattern-ul expresiei mucinelor a fost exprimat foarte heterogen în carcinoamele mucinoase colorectale (MUC1 fiind frecvent exprimat și la un

nivel mai înalt decât în mucoasa intestinală normală, MUC2 exprimat difuz, MUC5AC cu imunoreactivitate slabă și focală).

Budding-ul tumoral, examinat prin prisma factorului prognostic reprezentat de invazia limfo-vasculară a carcinoamelor colorectale cercetate, a relevat o intensitate mare a fenomenului de budding (≥ 10 arii/câmp microscopic) la un număr important de cazuri.

CONCLUZII

Studiul histopatologic și imunohistochimic realizat în intervalul de timp 2008-2011, asupra unui număr de 82 carcinoame colorectale cu producție excesivă de mucină, a fost urmat de obținerea următoarelor constatări:

- Lotul studiat de carcinoamelor colorectale cu secreție în exces de mucină a reprezentat un procent de 13,62% din totalul celor 602 cazuri de carcinoame colorectale, cazuistica cercetată fiind mai frecventă la sexul masculin și la persoanele cu vârsta peste 70 de ani.
- Leziunile pretumorale asociate carcinoamelor studiate (adenoame la distanță de tumoră sau incluse în periferia tumorii) s-au corelat semnificativ statistic cu histologia mucinoasă a tumorilor colorectale studiate.
- Parametrii histopatologici cu valoare prognostică (invazia vasculo-limfatică și peineurală, implanturile tumorale și marginea de rezecție circumferențială) nu au relevat corelații semnificative statistic ($p > 0,05$) cu tipul mucinos sau non-mucinos al carcinoamelor colorectale în intervalul de timp studiat 2008-2011.
- Pentru carcinoamele colorectale secretante de mucină în exces, considerăm că expresia mucinelor (MUC1, MUC2 și MUC5AC), a fenotipurilor MUC2/MUC1 și CK20/CK7 realizate, a factorului de transcripție nuclear CDX2, precum și cel al oncoproteinei p53, indică legătura dintre carcinogeneza colorectală și fenotipul tumoral, în timp ce expresia markerului de proliferare Ki-67, a factorului de creștere vasculară (VEGF), a imunomarkerului CD8 (pentru limfocitele T citotoxice implicate în mecanismul imunologic tumoral), coroborat cu expresia MMP-9 (cu rol în degradarea matrixului extracelular) și fenomenul de budding tumoral, oferă informații despre comportamentul biologic al tumorilor studiate.