

Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Școala Doctorală

TEZĂ DE DOCTORAT

***METODE IMAGISTICE ACTUALE DE EVALUARE A
ANGIOGENEZEI TUMORALE LA PACIENȚII CU CANCER
COLORECTAL***

-REZUMAT-

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. Adrian Săftoiu**

**Student doctorand,
Elena Tatiana Cârțână**

CRAIOVA

2012

CUPRINS

INTRODUCERE	2
CONTRIBUȚII PROPRII.....	3
MATERIAL ȘI METODĂ	3
REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	5
Rolul endomicroscopiei confocale laser în diagnosticul și evaluarea angiogenezei tumorale la pacienții cu cancer colorectal	6
Rolul ecoendoscopiei cu contrast în evaluarea pacienților cu cancer colorectal	9
CONCLUZII.....	12
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	14

CUVINTE CHEIE

Cancer colorectal (CRC), angiogeneză, endomicroscopie confocală laser (CLE), imunoendoscopie, ecoendoscopie transrectală (EUS), ecoendoscopie cu substanță de contrast (CE-EUS)

INTRODUCERE

Cancerul colorectal (CRC) este o cauză importantă de morbiditate și mortalitate, 1.200.000 de cazuri noi fiind diagnosticate anual la nivel mondial (1). Este caracterizat de o variabilitate interregională a incidenței aflată sub influența factorilor de risc comportamentali și a predispoziției genetice (2). Deși datele la nivel național sunt limitate, s-a observat totuși o creștere constantă a numărului de cazuri diagnosticate, fiind în prezent cel mai frecvent întâlnit cancer digestiv, și implicit s-a înregistrat o tendință nefavorabilă a ratei mortalității (3, 4).

Tratamentul CRC necesită o abordare multidisciplinară, chirurgicală, chimio- și radioterapică. Dezvoltarea terapilor biologice direcționate spre inhibiția factorului de creștere vasculo-endotelial (bevacizumab) sau a receptorului factorului de creștere epidermal (cetuximab, panitumumab) reprezintă un pas important în oncologie ce a adus posibilitatea creșterii supraviețuirii pacienților (5). Acești agenți fac parte deja din schemele de tratament în cazurile metastatice de CRC, în regimuri combinate cu medicamente citotoxice. Alegerea strategiei terapeutice adecvate fiecărui pacient este însă o decizie complexă, marcată încă de necunoscute, astfel încât pentru a progresa spre terapii individualizate este necesară descrierea unor biomarkeri predictivi ai răspunsului la tratament.

Angiogeneza este un proces esențial creșterii tumorale și metastazării, rezultat din interacțiunea a numeroși factori de creștere și molecule de semnalizare care determină activarea unui status pro-angiogenetic (6). Ținând cont că rolul prognostic al angiogenezei tumorale este încă controversat, importanța cunoașterii acestui proces rezultă mai ales din dezvoltarea și optimizarea de noi strategii terapeutice pentru pacienții oncologici. Tehnicile folosite în mod obișnuit pentru evaluarea angiogenezei includ studii genetice și metode imunohistochimice de determinare a unor factori angiogenici (7). Acestea sunt însă metode bazate pe prelevarea de țesut, supuse inevitabil erorilor de eșantionare, în timp ce o înțelegere pe deplin a mecanismelor biologice implicate necesită studiul morfologic și funcțional al angiogenezei *in vivo*.

Endomicroscopia confocală laser reprezintă o tehnică nouă endoscopică ce permite analiza microscopică a mucoasei gastrointestinale, cu ajutorul substanțelor de contrast administrate topic sau sistemic (8). Numărul aplicațiilor sale clinice este în creștere și, dincolo de aspectele morfologice descriptive ale mucoasei, a făcut posibile examinări funcționale și la nivel

molecular, ceea ce a dus la dezvăluirea de noi oportunități pentru cercetarea clinică și fundamentală.

Ultrasonografia cu substanță de contrast este o tehnică imagistică intens utilizată pentru caracterizarea și detectarea leziunilor prin aprecierea comportamentului microvascularizației lor. Ulterior a fost recunoscută ca o metodă adecvată pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul antiangiogenic, capabilă să recunoască modificări precoce în vascularizația tumorală (9). Tehnica examinării cu contrast a fost adoptată și în asocieră cu endoscopia ultrasonografică, beneficiind de avantajele unei metode imagistice de înaltă rezoluție (10).

În acest context am utilizat două metode imagistice noi, minim invazive, reprezentate de endomicroscopia confocală laser și ecoendoscopia cu substanță de contrast, pentru evaluarea angiogenezei în cancerul colorectal, urmărind îmbunătățirea diagnosticului și descrierea caracteristicilor histologice, dar și o analiză cantitativă a microvascularizației.

CONTRIBUȚII PROPRII

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul s-a desfășurat în cadrul *Clinicii de Gastroenterologie a UMF Craiova* și *Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova* în perioada ianuarie 2010 – iunie 2012, având caracter prospectiv, și a cuprins mai multe loturi de pacienți.

Lotul I a inclus 119 pacienți cu cancer colonic și rectal pentru un studiu al principalelor caracteristici clinice și demografice. Aceștia au fost suspecionați de CRC prin prezența manifestărilor digestive de tipul: dureri abdominale, tulburări de tranzit, hematochezie sau rectoragii, tenesme, scădere ponderală sau a sindromului anemic, fără alte simptome gastrointestinale.

Datele au fost achiziționate printr-un formular structurat și au inclus date personale, date clinice relevante (istoric medical, simptome, examen obiectiv), rezultatele explorărilor biologice și imagistice, precum și examenul histopatologic și imunohistochimic.

Diagnosticul de CRC s-a bazat pe examinarea colonoscopică și confirmarea prin examenul histopatologic al biopsiilor prelevate de la nivelul formațiunilor tumorale.

Analiza statistică a presupus utilizarea testelor statisticii descriptive (medie, deviație standard, minim, maxim). Variabilele categorice au fost exprimate procentual.

Lotul II a inclus 32 pacienți examinați prospectiv prin CLE în cadrul Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie al UMF Craiova, repartizați astfel: pacienți cu adenocarcinoame colorectale (n=16), pacienți cu polipi adenomatoși (n=6), pacienții cu colită (n=10). Pentru control a fost examinată și mucoasa normală a pacienților cu neoplazii colorectale, la distanță de cel puțin 10 cm de marginea tumorală.

Toți pacienții au fost examinați *in vivo* prin CLE, folosind ca substanță de contrast fluoresceina (10%, 5 ml, i.v.), cu stocarea imaginilor în format digital pentru analiză ulterioară. Aceasta a presupus analiza parametrilor de textură, urmărind atât caracterizarea tiparelor texturale asociate celor 3 tipuri de leziuni colorectale (carcinom, adenom, inflamație) și mucoasei normale, cât și determinarea parametrilor optimi pentru clasificarea obiectivă a acestora. Imaginile au fost prelucrate cu ajutorul programului de analiză a imaginii de domeniu public ImageJ (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SUA*) și a modulului asociat de analiză a texturii, GLCM. Rezultatele au fost comparate cu examenul histopatologic al biopsiilor prelevate.

Analiza statistică.

Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm SD și interval de încredere 95%. Pentru comparații între mai multe grupuri am folosit testul one-way ANOVA, urmat de analiza post-hoc prin testul Bonferroni, considerând semnificativ statistic $p < 0,05$. Performanța parametrilor urmăriți a fost evaluată prin analiza curbelor ROC cu identificarea valorilor *cut-off* și obținerea specificității și sensibilității diagnostice.

Lotul III a inclus 6 pacienți cu adenocarcinom colorectal la care s-au prelevat biopsii pereche din mucoasa colorectală normală (de la cel puțin 10 cm distanță de tumoră) și din formațiunea tumorală propriu-zisă. Acestea au fost colorate specific folosind anticorpi marcați fluorescent anti-CD31 și examinate *ex vivo* prin CLE.

Imaginile salvate au fost supuse unei analize morfometrice vasculare cu ajutorul programului ImageJ, rezultatele fiind comparate cu imunohistochimia convențională.

Analiza statistică. Rezultatele au fost exprimate ca medie \pm eroare standard. Pentru comparația între vascularizația țesutului normal și a celui tumoral am utilizat testul *t two-tailed*, $p < 0,05$ fiind considerat semnificativ statistic.

Lotul IV a inclus prospectiv 18 pacienți cu tumori rectale și colonice, examinați în cadrul Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova prin endoscopie ultrasonografică inferioară (EUS) cu administrare de substanță de contrast (CE-EUS).

Examinarea CE-EUS s-a efectuat cu ajutorul modulului specific (*dynamic wide-band contrast harmonic imaging mode*) la index mecanic 0,2. Au fost salvate secvențe video de minim 60 sec, ce au fost ulterior analizate cu ajutorul programului Image-Pro Plus 6.0 (*Media Cybernetics, Bethesda, SUA*), urmărind o evaluare cantitativă a perfuziei tumorale.

Pe baza curbelor de intensitate-timp au fost determinați următorii parametri: valoarea maximă a intensității (Imax), timpul de sosire a contrastului (AT), timpul până la Imax (TTP) și aria de sub curbă (AUC), urmărind variația acestora cu factori de prognostic anatomopatologici (stadiul T, N conform examinării EUS sau examenului histopatologic al pieselor de rezecție, gradul de diferențiere).

Analiza statistică. Rezultatele au fost exprimate ca valori medii \pm SD, interval de încredere 95% al mediei, minim, maxim, iar comparațiile între seturile de date s-au făcut prin testul *t* pentru două variabile independente, considerând valoarea $p < 0,05$ semnificativă statistic. Pentru stabilirea corelațiilor dintre variabile a fost utilizat testul de corelație *r Spearman*.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe parcursul perioadei studiate 119 pacienți au fost diagnosticați cu cancer colorectal în cadrul Laboratorului de Endoscopie al *Clinicii de Gastroenterologie a UMF Craiova*, reprezentând 10,5% din totalul colonoscopiilor efectuate în acest interval.

Pentru acești pacienți vârsta medie a fost de $67,10 \pm 10,23$ ani, cu limitele cuprinse între 34 și 90 ani. Cele mai multe cazuri au fost diagnosticate începând cu decada a șasea, 92,4%

dintre pacienți având vârsta peste 50 ani. Repartiția pe sexe a lotului studiat a arătat predominanța cancerului colorectal la bărbați (67%).

Peste 50% dintre tumorile identificate la colonoscopie au fost localizate la nivelul rectului și sigmoidului, distribuția pe segmentele colonului fiind după cum urmează: 5 cazuri la nivelul cecului (4,2%), colon ascendent 14 pacienți (11,76%), flexura hepatică 11 cazuri (9,24%), colon transvers 6 cazuri (5,04%), flexura splenică 3 pacienți (2,52%), colon descendent 12 pacienți (10,08%), sigmoid 30 cazuri (25,21%), rect 38 cazuri (31,93%).

La examenul histopatologic al biopsiilor prelevate endoscopic majoritatea tumorilor au fost reprezentate de adenocarcinoame moderat diferențiate (70,6%).

Rolul endomicroscopiei confocale laser în diagnosticul și evaluarea angiogenezei tumorale la pacienții cu cancer colorectal

Studiul in vivo – Analiza texturii imaginilor de endomicroscopie

În cadrul acestui studiu au fost incluse într-o analiză computerizată cel puțin 5 imagini de endomicroscopie dintre cele salvate pentru fiecare dintre cazurile examinate. În total au fost analizate 256 imagini, distribuite astfel: 80 pentru CRC, 70 pentru mucoasa normală, 30 pentru polipi colorectali, 76 pentru colită.

Cei 5 parametri de textură GLCM (contrastul, corelația, entropia, momentul unghiular de ordinul doi și omogenitatea) au fost determinați folosind două dimensiuni ale pasului dintre pixeli (1 și 5 pixeli) și două direcții de orientare (0° și 90°), ceea ce a dus la calcularea a 20 variabile pentru fiecare imagine. Aplicând testul ANOVA am găsit diferențe semnificative statistic ($< 0,001$) între mediile grupurilor pentru fiecare dintre parametrii analizați, iar în continuare analiza post-hoc a evidențiat grupurile diferite ca medie. Parametrii care au putut diferenția CRC atât de mucoasa normală, cât și de adenoamele colorectale și colită au fost momentul unghiular de ordinul doi la pas de 1 pixel și 0° și omogenitatea la 5 pixeli și 0° , respectiv 90° , valorile mediilor fiind diferite semnificativ (**Tabel 1**).

Analizând capacitatea acestor parametri de a discrimina cazurile de CRC de mucoasa normală am identificat o arie sub curba ROC de până la 0,750 (95% CI, 0,673 - 0,817, $p=0,0001$) pentru parametrul omogenitate calculat la 5 pixeli și 90° . Pentru acest parametru

valoarea *cut-off* a fost 0,136 peste care CRC a putut fi diferențiat de mucoasa normală colorectală cu sensibilitate 52,50%, specificitatea 88,57% (VPP 84%, VPN 62%).

Tabel 1 - Parametrii GLCM care au demonstrat că pot diferenția CRC de mucoasa normală și leziunile benigne colorectale

	ASM 1 pix; 0°	IDM 5 pix; 0°	IDM 5 pix; 90°
CRC	0,0077 ± 0,0132 (0,0048 - 0,0106)	0,1436 ± 0,0418 (0,1345 - 0,1527)	0,1404 ± 0,0423 (0,1310 - 0,1498)
Normal	0,0031 ± 0,0062 (0,0011 - 0,0051)	0,1220 ± 0,0446 (0,1116 - 0,1324)	0,1087 ± 0,0386 (0,0995 - 0,1179)
Polip	0,0005 ± 0,0004 (0,0004 - 0,0007)	0,0882 ± 0,0251 (0,0788 - 0,0975)	0,0835 ± 0,0247 (0,0743 - 0,0927)
BII	0,0012 ± 0,0025 (0,0007 - 0,0018)	0,1205 ± 0,0312 (0,1134 - 0,1276)	0,1158 ± 0,0299 (0,1090 - 0,1227)
ANOVA	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001

ASM - moment unghiular de ordinul doi; IDM - omogenitate. CRC - cancer rectocolonic; BII - boală inflamatorie intestinală. Valorile sunt exprimate ca medie ± SD (95% CI)

A fost analizată și capacitatea celor trei parametri de a diferenția țesutul malign de cel benign (mucoasă normală, adenoame, colită). Momentul unghiular de ordinul doi (1 pix; 0°) a fost cel mai bun clasificator, cu o arie sub curba ROC de 0,783, iar o valoare *cut-off* de 0,0009 a permis diferențierea CRC de grupurile control cu sensibilitate de 81,2% și specificitate 70,5% (VPP 55,6%, VPN 89,2%).

Analiza texturii este o metodă folosită pentru interpretarea și clasificarea imaginilor medicale încă din 1973, inițial fiind aplicată pe imagini radiologice și de ecografie. În ultimii ani a fost abordată cu interes crescut, fiind publicate numeroase studii ce au raportat aplicarea analizei texturii pe secțiuni CT și RMN, într-o varietate de patologii maligne și benigne, inclusiv în cazul CRC (11).

Până în prezent analiza texturii nu a mai fost aplicată pentru clasificarea leziunilor colorectale pe baza imaginilor de endomicroscopie. Un studiu pilot *ex vivo* a demonstrat fezabilitatea unei astfel de analize cantitative în cazul esofagului Barrett, utilizând imagini obținute prin examinarea cu un sistem de microendoscopie a țesutului proaspăt rezecat endoscopic (12).

Atât momentul unghiular de ordinul doi (numit și energia) cât și omogenitatea, care au arătat prin studiul prezentat că pot fi folosiți pentru clasificarea leziunilor colorectale, reprezintă

o măsură a omogenității, valorile scăzute indicând scăderea omogenității pentru imaginea analizată. Astfel ambii parametri au avut valori descrescătoare pentru mucoasa normală, colită, adenom. Paradoxal însă, valorile medii pentru mucoasa din CRC au fost mai mari comparativ cu aceste grupuri. Similare, într-un studiu recent ce a analizat textura imaginilor înregistrate la colonoscopia cu magnificație, aceiași parametri, indicatori ai omogenității, au înregistrat valori crescute pentru tipul V_N , asociat cu carcinoamele cu invazie masivă în submucoasă conform clasificării modificate de Kudo și Tsuruta (13). O explicație ar putea fi aceea că neoplaziile maligne invazive sunt caracterizate prin distrugerea histologică a criptelor glandulare care sunt înlocuite de celulele maligne, ca rezultat al unei proliferări clonale, iar țesutul malign, cu totul dezorganizat, devine astfel o structură simplificată, amorfă.

Analiza texturii oferă informații dincolo de ceea ce este disponibil inspecției vizuale directe a examinatorului, fără a necesita achiziționarea suplimentară de imagini. Pe viitor, determinarea unei combinații optime între mai mulți parametri GLCM, ar putea duce la ameliorarea semnificativă a acurateții diagnostice.

Studiul ex vivo - Fezabilitatea endomicroscopiei confocale laser pentru studiul morfometric al microvascularizației în cancerul colorectal folosind anticorpi anti-CD31

Acest studiu a inclus biopsii pereche de țesut normal și tumoral ce au fost prelevate de la 6 pacienți cu CRC avansat pentru colorație specifică cu anticorpi anti-CD31 marcați fluorescent și examinare prin CLE. Au fost analizate 60 imagini din totalul celor salvate, respectiv 5 imagini pentru fiecare probă de țesut normal sau patologic.

Cu ajutorul CLE a fost detectat un semnal fluorescent specific în toate biopsiile examinate, observându-se diferențe între vasele de sânge normale și neoplazice. Vascularizația țesutului normal a format o rețea regulată, într-un model cu aspect de fagure de miere. Pe de altă parte, vasele din țesutul tumoral au fost tortuoase și vizibil mai dilatate, neregulate, cu diametre variabile de-a lungul lor. Aspectul vascularizație este un criteriu folosit pentru clasificarea leziunilor colorectale și la examinarea CLE *in vivo*, utilizând fluoresceina ca substanță de contrast cu proprietăți de colorare nespecifice (14). În studiul prezentat am folosit o colorație specifică endotelială, care a permis în plus o analiză morfometrică prin evidențierea segmentelor vasculare în întregime.

Astfel diametrul mediu pentru vasele tumorale a fost $13,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (95% CI 12,6 - 14,5), semnificativ mai mare comparativ cu vasele de sânge normale ($8,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$, 95% CI 7,6 - 9,3, $p < 0,0001$). Densitatea vasculară medie pentru țesutul malign a fost de $242,4 \pm 11,0 \text{ vase/mm}^2$ (95% CI 219 - 266 vase/mm²), iar pentru țesutul normal $188,7 \pm 12,8 \text{ vase/mm}^2$ (95% CI 162 - 215, $p = 0,0027$). Diagrama distribuției diametrelor vasculare a demonstrat prezența mai multor vase de diametre mai mari în țesutul tumoral comparativ cu mucoasa normală colorectală. Astfel, în timp ce 66,3% din valorile obținute pentru vasele normale au fost $\leq 10 \mu\text{m}$ diametru, 74,8% din vasele tumorale au depășit această limită.

Rezultatele obținute au fost validate de imunohistochimia convențională care a demonstrat un marcaj pozitiv pentru CD31 atât în tumoră cât și control și o tendință a vaselor din țesutul malign spre densități și arii vasculare crescute, în concordanță cu rezultate publicate anterior (15). Pe biopsiile din mucoasa normală valoare medie a MVD normalizată la un mm² a fost $211,2 \pm 42,9$, în timp ce pentru țesutul malign aceasta a fost $351,3 \pm 39,6/\text{mm}^2$ ($p = 0,1072$). Aria vasculară a fost de aproape 3 ori mai mare în cancerul colorectal ($8,5 \pm 2,1\%$) comparativ cu secțiunile normale ($2,9 \pm 0,5\%$), $p = 0,0536$. Deși diferențele sunt evidente nu a fost atinsă semnificația statistică, probabil datorită numărului mic de probe studiate.

În studii anterioare examinarea la nivel molecular prin CLE a reușit evidențierea VEGF și EGFR, două ținte terapeutice deja stabilite pentru cancerul colorectal avansat (16-18). Acesta pare să fie însă primul studiu care utilizează anticorpi marcați fluorescent direcționați împotriva unui marker endotelial (CD31) în combinație cu examinarea endomicroscopică. Această metodă duce la rezultate similare cu cele obținute prin imunohistochimia tradițională, dar folosind țesut proaspăt, nefixat. Este evitat astfel orice artefact legat de prelucrarea biopsiilor, iar obținerea imaginilor din țesut este posibilă la scurt timp după prelevarea probelor ceea ce facilitează un diagnostic mai rapid (19). Se pun astfel bazele unei noi tehnici translaționale, *imunoendoscopia*, care este însă condiționată de apariția unor substanțe de contrast specifice cu aplicabilitate în studii clinice.

Rolul ecoendoscopiei cu contrast în evaluarea pacienților cu cancer colorectal

În acest studiu au fost inițial examinați prin EUS cu administrare de contrast 20 pacienți cu CRC, fiind incluși în studiu 18 dintre ei, pentru care înregistrările CE-EUS au putut fi supuse

analizei cantitative. Vârsta medie a acestor pacienți a fost $65,33 \pm 8,15$ ani, majoritatea aparținând sexului masculin (16 cazuri). Stadializarea loco-regională, evaluată prin EUS sau post-operator, în cazul pacienților care au urmat intervenție chirurgicală, a arătat că majoritatea pacienților au avut stadii avansate tumorale, 15 fiind T3 și T4, printre aceștia găsindu-se și cei 9 pacienți cu metastaze ganglionare. La examenul histopatologic cele mai multe tumori au fost adenocarcinoame moderat diferențiate.

Majoritatea cancerelor colorectale examinate prin CE-EUS au fost bine vascularizate, 15 din ele captând substanța de contrast în faza arterială. Modelul încărcării la administrarea contrastului a fost fie global, fie neomogen, mai accentuat periferic și cu zone necaptante către lumenul intestinal, probabil prin prezența ariilor de necroză tumorală. În 3 cazuri examinarea a identificat un aspect hipocaptant global al tumorii.

Analiza curbelor intensitate-timp pe baza secvențelor înregistrate a permis o evaluare cantitativă a vascularizației tumorale, valorile medii \pm SD ale parametrilor calculați fiind prezentate în tabelul următor:

Tabelul 2 - Valorile parametrilor calculați pe baza curbelor intensitate-timp

Parametru TIC	Valoare medie \pm SD	Interval (min - max)
AT (s)	$10,08 \pm 3,85$	4,17 - 16,67
TTP (s)	$24,03 \pm 10,94$	9,33 - 56,17
Imax (a.u.)	$41,43 \pm 19,24$	10,1 - 80,1
AUC (a.u.*s)	$5477,45 \pm 2922,68$	830,1 - 11735

a.u. - unități arbitrare

A fost identificată o corelație inversă între prezența invaziei ganglionare și parametrii Imax și AUC, însă fără a atinge semnificația statistică (Spearman $r = -0,439$, $p = 0,0683$). Atât Imax, cât și AUC au avut valori mai scăzute în prezența invaziei ganglionare, comparativ cu stadiile N0 ($32,37 \pm 16,86$ a.u. vs. $50,59 \pm 17,82$ a.u., $p = 0,0415$, respectiv 4023 ± 2243 a.u.*s vs. 6932 ± 2891 a.u.*s, $p = 0,0298$).

Ceilalți parametri TIC nu s-au corelat cu niciunul dintre factorii anatomopatologici analizați.

Apariția substanțelor de contrast pentru examinarea ultrasonografică (CEUS) a permis creșterea detecției leziunilor benigne și maligne și caracterizarea lor din punct de vedere al

comportamentului vascularizației (9). Prin evaluarea în timp real a perfuziei intratumorale, CEUS oferă în același timp posibilitatea unei analize cantitative a patului vascular (20). Prin această metodă de examinare a fost demonstrat efectul precoce al terapiei antiangiogenice în carcinomul hepatocelular primitiv, carcinomul renal și metastazele hepatice ale CRC (21). Într-un studiu recent vascularizația adenocarcinoamelor corectale a fost evaluată prin ecografie transabdominală, găsind valori progresiv crescătoare ale AUC în subgrupurile T2, T3 și T4 (22). Același parametru AUC a fost semnificativ mai mare în cazul adenocarcinoamelor colorectale față de adenoame și s-a corelat pozitiv cu MVD determinat imunohistochimic (23).

Ecografia transabdominală este însă limitată în examinarea tubului digestiv de apariția artefactelor semnificative, induse de prezența aerului intraluminal, a peristalticii intestinale, grăsimii abdominale uneori în exces, neajunsuri ce pot fi depășite de CE-EUS.

Deși EUS este o metodă utilizată pentru evaluarea tumorilor rectale încă din 1985, recomandată actual de ghidurile internaționale pentru stadializarea preterapeutică a pacienților cu cancer rectal (24), rolul examinării cu contrast (CE-EUS) nu a fost urmărit în această patologie tumorală (25).

Prin studiul condus am demonstrat fezabilitatea acestei metode de examinare. Folosirea unui ecoendoscop radial cu vedere frontală a permis extinderea studiului și la nivelul tumorilor sigmoidiene și de colon ascendent. Au fost întâmpinate însă și câteva dificultăți în aplicarea metodei. Obținerea unui control al peretelui normal a fost îngreunată de extinderea circumferențială a unor tumori, dar și de dimensiunile sale reduse care îl fac o țintă dificil de menținut în aria de interes. În acest context, o analiză cantitativă este cu atât mai necesară, pentru a obține o imagine completă asupra modelului vascularizației. Aceasta a fost posibilă prin analiza offline a secvențelor video înregistrate și determinarea parametrilor curbelor intensitate-timp. Deși lotul studiat a fost unul mic pentru a trage concluzii cu încredere deplină, rezultatele arată că I_{max} și AUC au potențial ca factori de prognostic.

Pentru definirea rolului și optimizarea acestei tehnici de examinare sunt însă necesare studii suplimentare prospective care să includă un număr mai mare de pacienți, urmăriți în dinamică, pentru evaluarea răspunsului terapeutic în cazuri selectate.

CONCLUZII

- ❑ Cancerul colorectal este cel mai frecvent dintre cancerelor digestive, un factor important de morbiditate și mortalitate, iar pe perioada studiului desfășurat a fost diagnosticat în 10,5% din totalul colonoscoپیlor efectuate în cadrul Laboratorului de Endoscopie al Clinicii de Gastroenterologie a UMF Craiova.
- ❑ Endomicroscopia confocală laser (CLE) este o tehnică endoscopică recent introdusă care permite atât obținerea unui diagnostic histologic *in vivo*, pe baza aspectului microvascularizației și al criptelor glandulare, cât și o analiză obiectivă computerizată a imaginilor achiziționate.
- ❑ În cadrul analizei de textură desfășurată pentru secțiunile CLE, cei mai buni clasificatori s-au dovedit parametrii momentul unghiular de ordinul doi și omogenitatea GLCM, care au demonstrat diferențe semnificative între grupurile analizate, cu sensibilitate și specificitate bune și o arie de sub curba ROC de până la 0,783 pentru diferențierea CRC de grupurile control.
- ❑ Studii suplimentare pentru validarea rezultatelor și includerea acestor parametri de textură în modele automate de clasificare vor permite reducerea variabilității intra- și interobservator și creșterea consecutivă a acurateții diagnostice pentru leziunile colorectale.
- ❑ *Imunoendoscopia* este fezabilă din punct de vedere tehnic și ar putea fi utilizată pe viitor pentru o abordare individualizată a tratamentului oncologic. Folosind anticorpi marcați fluorescent direcționați împotriva unui marker endotelial (CD31) am arătat că este posibilă examinarea selectivă prin CLE a vaselor de sânge intratumorale și de la nivelul mucoasei normale colorectale, similar imunoendoscopiei convenționale, însă pe țesut proaspăt, nefixat.
- ❑ Aspectul rețelei microvasculare în probele de CRC la examinarea endomicroscopică a fost unul neregulat, cu vase dilatate, tortuoase, vizibil diferit de al modelului vascular normal.
- ❑ Analiza morfometrică a secțiunilor de CLE colorate specific pentru CD31 a demonstrat diferențe semnificative între rețelele vasculare normală și malignă, atât diametrul cât și densitatea vasculară fiind crescute în probele de țesut malign.

- ❑ Ecoendoscopia (EUS), utilizată pentru stadializarea preterapeutică a tumorilor rectale, s-a dovedit prin acest studiu fezabilă pentru evaluarea perfuziei tumorale colorectale prin examinarea cu substanță de contrast de generația a doua în mod armonios, cu index mecanic scăzut. În majoritatea cazurilor incluse tumorile s-au încărcat la administrarea substanței de contrast, complet sau neomogen prin prezența unor arii de necroză.
- ❑ Analiza asistată de computer a secvențelor video înregistrate a permis în plus o evaluare cantitativă a vascularizației intratumorale pe baza parametrilor obținuți din curbele intensitate-timp. Parametrii I_{max} și AUC au avut valori diferite semnificativ între cazurile cu și fără invazie ganglionară, sugerând un potențial rol al acestora ca factori de prognostic. Studii suplimentare prospective pe loturi mari de pacienți sunt însă necesare pentru optimizarea tehnicii de examinare și definirea rolului ei în evaluarea cancerului colorectal.
- ❑ Pe termen lung, aceste noi tehnici imagistice studiate ar putea permite pe de o parte accesul rapid al pacienților cu CRC la tratamentul adecvat prin posibilitatea obținerii cu ajutorul CLE a unui diagnostic histologic în timp real, validat prin metode obiective de clasificare, iar pe de altă parte monitorizarea atentă a terapiilor specifice antiangiogenice prin studiul cantitativ al vascularizației posibil prin examinarea CE-EUS.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adam R, Haller DG, Poston G et al. Toward optimized front-line therapeutic strategies in patients with metastatic colorectal cancer--an expert review from the International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT) 2009. *Ann Oncol* 2010; 21: 1579-1584.
2. Jemal A. et al. Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN* 2011;61:69–90.
3. Vălean S, Armean P, Resteman S, Nagy G, Mureșan A, Mircea PA - Cancer mortality in Romania, 1955-2004. Digestive sites: esophagus, stomach, colon and rectum, pancreas, liver, gallbladder and biliary tree. *J Gastrointest Liver Dis.* 2008; 17: 9-14.
4. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:366–78.
5. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 222-243.
6. de Castro Junior G, Puglisi F, de Azambuja E, El Saghir NS, Awada A. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the “do ut des” paradigm) *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;59:40–50.
7. Rasheed S, McDonald PJ, Northover JM, Guenther T. Angiogenesis and hypoxic factors in colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2008;204:501–10.
8. Goetz M, Kiesslich R. Advances of endomicroscopy for gastrointestinal physiology and diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298:G797-G806.
9. Piscaglia F, Nolsøe C, Dietrich CF, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): Update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med.* 2011 Aug 26.
10. Săftoiu A. State-of-the-art imaging techniques in endoscopic ultrasound. *World J Gastroenterol* 2011; 17(6): 691-696.
11. Davnall F, Yip CS, Ljungqvist G, Selmi M, Ng F, Sanghera B, Ganeshan B, Miles KA, Cook GJ, Goh V. Assessment of tumor heterogeneity: an emerging imaging tool for clinical practice? *Insights Imaging.* 2012 Dec;3(6):573-89.
12. Muldoon TJ, Thekkek N, Roblyer D, Maru D, Harpaz N, Potack J, et al. Evaluation of quantitative image analysis criteria for the high-resolution microendoscopic detection of neoplasia in Barrett’s esophagus. *J Biomed Opt.* 2010;15:026027.
13. Onji K, Yoshida S, Tanaka S, Kawase R, Takemura Y, Oka S, Tamaki T, Raytchev B, Kaneda K, Yoshihara M, Chayama K. Quantitative analysis of colorectal lesions observed on magnified endoscopy images. *J Gastroenterol.* 2011 Dec;46(12):1382-90.
14. Gheonea DI, *Cârțână T, Ciurea T, Popescu C, Bădărău A, Săftoiu A. Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies. World Journal of Gastroenterology* 2011;17(1):21–27.

15. Gao J, Knutsen A, Arbman G, Carstensen J, Frånlund B, Sun XF. Clinical and biological significance of angiogenesis and lymphangiogenesis in colorectal cancer. *Dig Liver Dis.*2009;41:116–122.
16. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138: 435-446.
17. Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Goetz M. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 2010; 59: 1046-1055.
18. Nakai Y, Shinoura S, Ahluwalia A, Tarnawski AS, Chang KJ. Molecular imaging of epidermal growth factor-receptor and survivin in vivo in porcine esophageal and gastric mucosae using probe-based confocal laser-induced endomicroscopy: proof of concept. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63(3):303-7.
19. *Cârțână T, Săftoiu A, Gruionu LG, Gheonea DI, Pirici D, et al. (2012) Confocal Laser Endomicroscopy for the Morphometric Evaluation of Microvessels in Human Colorectal Cancer Using Targeted Anti-CD31 Antibodies. PLoS ONE 7(12): e52815.*
20. Dietrich CF, Averkiou MA, Correas JM, Lassau N, Leen E, Piscaglia F. An EFSUMB Introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for Quantification of Tumour Perfusion. *Ultraschall Med.* 2012 Aug;33(4):344-351. Epub 2012 Jul 27.
21. Lassau N, Chebil M, Chami L, Bidault S, Girard E, Roche A. Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (DCE-US): a new tool for the early evaluation of antiangiogenic treatment. *Targeted Oncology.* 2010;5(1):53–58.
22. Zhuang H, Yang ZG, Wang ZQ, Wang XD, Chen HJ, Zhang YC, Luo Y. Features of time-intensity curve parameters of colorectal adenocarcinomas evaluated by double-contrast enhanced ultrasonography: Initial observation. *Eur J Radiol.* 2011 Feb 11. [Epub ahead of print]
23. Zhuang H, Yang ZG, Chen HJ, Peng YL, Li L. Time-intensity curve parameters in colorectal tumours measured using double contrast-enhanced ultrasound: correlations with tumour angiogenesis. *Colorectal Dis.* 2012 Feb;14(2):181-7.
24. Glimelius B, Pahlman L, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21: v82-86.
25. *Cârțână ET, Pârvu D, Săftoiu A. Endoscopic ultrasound: current role and future perspectives in managing rectal cancer patients. J Gastrointestin Liver Dis.* 2011 Dec;20(4):407-13.