

Universitatea "Ovidius", Constanța
Facultatea de Medicină

Rezumat

Teză de Doctorat

Determinări genetice în cancerul esofagian

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. Univ. Dr. Vasile Sârbu

DOCTORAND:
Dr. Bogdan Iulian Sandolache

Constanța 2015

INTRODUCERE

Cancerul de esofag este unul din cele mai agresive tipuri de cancer digestiv, diagnosticarea tardivă în țara noastră fiind cauzată de statusul socio-economic precar, precum și situației anatomice particulare a esofagului. Aproximativ 70% din pacienți suferă de o boală avansată loco-regional sau cu metastaze la distanță necunoscute în momentul descoperirii bolii. Pacienții sunt în general vârstnici, tarați și malnutriți, adesea cașectici. Frecvența sa a rămas constantă în ultimul deceniu și, în ciuda progreselor de tratament chirurgical și oncologic, mortalitatea rămâne extrem de ridicată, datorită acestei diagnosticări tardive, a metastazării rapide și terenului fragil al pacienților. Reprezintă a patra cauză de mortalitate prin cancer la bărbat după neoplasmul de plămân, neoplasmul de colon și neoplasmul de prostată. Deși în ultimii 15 ani s-a observat un progres în tratamentul acestei boli, există încă destule controverse în managementul optim al bolii.

Deși, așa cum am amintit mai sus, frecvența cancerului de esofag a rămas constantă, s-a înregistrat o scădere a numărului de cancere epidermoide și o creștere a cazurilor de adenocarcinom. Aceste 2 subtipuri reprezintă peste 90% din totalul cazurilor, restul fiind tumori rare: melanoame, carcinoide, sarcoame, limfoame. Drenajul limfatic particular al esofagului și absența seroasei explică metastazarea rapidă și la distanță, metastazarea locală în mediastin fiind foarte greu de rezolvat chirurgical.

Chirurgia esofagului, ca tratament al cancerului de esofag prezintă dificultăți tehnico-tactice deosebite, comparativ cu alte organe datorită: poziției sale greu accesibile, a raporturilor cu organe vitale la nivel toracic, precum și din cauza necesității mobilizării viscerelor abdominale pentru reconstrucția acestuia.

Cancerul, în general, și cancerul esofagian, în particular, este o maladie complexă care apare ca rezultat al acumulării progresive de aberații genetice și modificări epigenetice ce scapă de sub controlul celular normal. Celulele neoplazice pot avea numeroase aberații genetice dobândite: aneuploidia, rearanjări cromozomiale, amplificări, deleții, recombinări genice și mutații care duc la pierderea sau câștigul unei funcții. Aberațiile conduc la o comportare anormală comună tuturor celulelor neoplazice: creștere neregulată, lipsa inhibiției de contact, instabilitate genomică și probabilitatea de metastază.

În neoplasmul esofagian mecanismele responsabile de instalarea și evoluția bolii sunt de parte de a fi elucidate. În acest context, cercetările sunt orientate către identificarea determinantilor moleculari ai inducerii și progresiei tumorale în scopul realizării unui diagnostic precoce, preventiv și predictiv al evoluției bolii, dar și a unor noi scheme de tratament individualizat.

În mai multe tipuri de cancer, biomarkerii au îmbunătățit capacitatea noastră de diagnostic, prognostic, tratament și predicție. În general, un biomarker adecvat ar trebui să fie util în definirea și identificarea riscurilor în primele stadii ale carcinogenezei. În plus, biomarkerii pot fi analizați atât dintr-o perspectivă non-invazivă, cât și dintr-o perspectivă economică și, prin urmare, este important să investim în căutarea mai multor biomarkeri. Au fost identificate gene care sunt considerate potențiale candidate pentru strategiile terapeutice individualizate, orientate în special, față de ținte moleculare specifice.

Lumea medicală manifestă un interes deosebit pentru introducerea în terapie a unor agenți antitumorali specifici (anticorpi, inhibitori ai receptorilor factorilor de creștere, antagoniști ai

factorilor de transducție a semnalelor, vaccinuri cu celule care prezintă antigene) în asociere sau nu cu tratamentul chimioterapic. Diagnosticarea și tratarea timpurie sunt măsuri eficiente de reducere a ratei mortalității bolnavilor cu cancer esofagian, însă majoritatea pacienților care se supun unui tratament intraspitalicesc sunt într-un stadiu avansat al bolii. Unul dintre cei mai responsabili factori care conduc la această situație este faptul că nici un marker molecular prezent în stadiul incipient nu este folosit în diagnosticarea și tratamentul cancerului de esofag. Alegerea diferitelor măsuri de tratament depinde în mare măsură de stadiul clinic al bolii.

Modificările genetice în cancerul esofagian au fost raportate ca mutații punctiforme la nivelul genelor p53 și p16, amplificări ale int-2, hst-1, ciclina D1 și EGFR, precum și pierderea heterozigoției genelor în multe regiuni cromozomiale. Totuși, sunt încă neclare detaliile evenimentelor moleculare care cauzează transformarea malignă a epiteliului esofagian. Două clase de gene, proto-oncogenele și genele supresoare tumorale, au roluri cheie în procesul de apariție și evoluție a cancerului. Majoritatea cancerelor posedă mutații inactivante în una sau mai multe proteine care, în mod normal, funcționează pentru a restrânge progresia către stadiul G1 al ciclului celular (ex. Rb și p16). Studiile de specialitate au emis mai multe teorii, venite să explice transformarea malignă văzută ca o dereglare a ciclului biologic normal al celulei: teoria mutației genetice, teoria diferențierii aberante, teoria virotică, teoria selecției celulelor.

Pentru medicul clinician, un progres real în descoperirea precoce sau în stabilirea prognosticului, elemente cu un impact major asupra ratei supraviețuirii bolnavilor, nu poate fi făcut în acest moment prin tehnicile de investigații macroscopice uzuale. Progresul în acest domeniu se poate realiza prin studierea mecanismelor moleculare ale carcinogenezei, respectiv prin înțelegerea complexă a mecanismelor genomice și proteomice care duc la apariția și dezvoltarea cancerului.

Studiul de față își propune să treacă la un alt nivel tratamentul afecțiunilor neoplazice esofagiene, abordând particularitățile genetice și modificările produse la acest nivel ce au determinat apariția bolii. S-a dorit să se demonstreze că fiecare modificare genetică duce la apariția unor forme histologice de neoplazii. Analizând fiecare din aceste forme se poate obține un protocol de depistare precoce și tratament individualizat în funcție de organul afectat, tipul histopatologic de neoplazie și modificarea genetică existentă. Extinzând conceptul, acest protocol poate fi aplicat și membrilor familiilor acestora în vederea determinării modificărilor genetice prezente, în scopul depistării și tratării precoce a neoplaziilor luate în studiu.

Este binecunoscut faptul că depistarea precoce a modificărilor genetice ce sunt însoțite de neoplazii poate duce la tratarea din timp a acestora în forme incipiente și, implicit, la creșterea duratei de supraviețuire a bolnavului oncologic și a calității vieții acestuia.

Lucrarea este structurată astfel: partea generală începe cu o scurtă prezentare a anatomiei esofagului, continuă cu date despre fiziologia, morfologia și patologia acestui segment digestiv, utile în înțelegerea sindromului esofagian, și amintește date despre genetica cancerului esofagian. Partea personală sau specială a lucrării cuprinde mai întâi descrierea materialului și metodelor de lucru folosite, urmată de detalierea rezultatelor obținute în urma efectuării acestui studiu.

Această lucrare se constituie ca o încercare timidă, din partea unui chirurg, de a aborda și aspecte de cercetare, în acest vast domeniu al biologiei celulare și moleculare, cu implicații directe în tratamentul patologiei tumorale maligne esofagiene.

I. PARTE GENERALĂ

Capitolul I

DATE DE ANATOMIE ESOFAGIANĂ

Esofagul este un conduct muscular, lung de aproximativ 25 cm, care se extinde de la nivelul faringelui până la stomac, având limita superioară la nivelul planului care trece prin marginea inferioară a cartilajului cricoid și limita inferioară la joncțiunea esogastrică, la nivelul orificiului cardia (4). Esofagul prezintă 3 porțiuni: cervicală, toracală și abdominală.

Calibrul esofagului este inconstant cu un diametru mediu de 2 cm și prezintă trei strâmțori esofagiene care, deși nu sunt omologate în NA, au mare importanță practică:

- a) *superioară* sau *cricoidiană* este situată în dreptul cartilajului omonim;
- b) *mijlocie* sau *bronhoaortică* la nivelul unde esofagul e încrucișat anterior de bronhia stângă și arcul aortic;
- c) *inferioară* sau *diafragmatică* la trecerea prin hiatusul esofagian al diafragmei (1);

Capitolul II

STRUCTURA ESOFAGULUI

Am menționat mai sus că esofagul are rolul de a face legătura și de a transporta alimentele de la nivelul faringelui spre stomac, și este împărțit, din punct de vedere topografic, în trei segmente, fiecare având particularitățile lui (6,9):

- Cervical, format din fibre musculare striate;
- Toracic, format din fibre musculare striate și netede. La acest nivel, sunt prezente următoarele strâmtori: cricoidiană, aortică, bronșică și cardiacă;
- Abdominal, format din fibre musculare netede. Se întinde de la hiatusul esofagian până la cardia, inferior de aceasta găsindu-se strâmtoarea diafragmatică sau inferioară, determinată de țesutul conjunctiv și de contracția fibrelor musculare netede din stratul intern al tunicii musculare a esofagului (5, 6, 9).

Peretele esofagian este format din (9):

A. Tunica mucoasă

- Mucoasa este căptușită de un epiteliu pavimentos pluristratificat nekeratinizat și îi sunt anexate glande esofagiene, ce secretă mucus (fără rol în digestia propriu-zisă), favorizând astfel alunecarea bolului alimentar.
- În porțiunea abdominală a esofagului, se observă zone tapetate de epiteliu de tip gastric, unistratificat cilindric și chiar glande gastrice. Trecerea de la epiteliul pluristratificat pavimentos nekeratinizat la epiteliul de tip gastric se realizează brusc, fiind obiectivată de prezența unei linii dințate ce separă mucoasa esofagiană de culoare roșu, mai palid și mucoasa gastrică, roșu aprins (5). Aceasta zonă poate constitui punctul de plecare al unor metaplazii și neoplazii esofagiene (adenocarcinoame).

Esofagul Barrett reprezintă metaplazia columnară a epiteliului esofagian la mai mult de 3 centimetri de linia Z, datorată agresiunii prelungite a acidului clorhidric în urma refluxului gastroesofagian. În funcție de aspectul macroscopic, acesta poate fi de 3 tipuri: Barrett insular, Barrett "în flacără" și Barrett circumferențial. Din punct de vedere microscopic, metaplazia poate fi cu epiteliu de tip intestinal (cu risc major de malignizare), de tip joncțional (asemănător epiteliului din zona cardiei) sau fundic (asemănător epiteliului gastric) (5). Diagnosticul pozitiv este obiectivat de prezența celulelor caliciforme, ce au caractere morfologice de hibrid, între epiteliul scuamos și cel columnar (5).

Esofagul Barrett poate evolua spre adenocarcinom. Diagnosticul pozitiv poate fi dificil, deoarece displazia poate ocupa doar o suprafață limitată din mucoasă, biopsia endoscopică ratând zonele degenerate malign (5).

- La limita dintre mucoasă și submucoasă se află musculara mucoasei, al cărei tonus determină plicaturarea longitudinală a mucoasei esofagiene.

B. Tunica submucoasă

- La acest nivel, se găsesc țesutul conjunctiv lax, o bogată rețea vasculară, plexurile autonome submucoase (superficial Meissner și profund Henle), cât și partea secretorie a glandelor esofagiene.

C. Tunica musculară

Exceptând faptul că în partea superioară musculatura este atât striată, cât și netedă, în partea inferioară această tunică prezintă fibre musculare netede dispuse în 2 straturi: intern – format din fibre musculare circulare și extern – format din fibre musculare longitudinale.

În neoplasmele musculare (sarcoame), afectarea predominantă a uneia dintre cele două tipuri de fibre duce la evoluții diferite: sarcoamele fibrelor longitudinale se extind în lungime și au evoluție îndelungată până la apariția disfagiei, spre deosebire de sarcoamele fibrelor circulare care se însoțesc de apariția rapidă a disfagiei (9).

Particularitatea acestei tunici este reprezentată de grosimea egală a celor două straturi, în comparație cu restul tubului digestiv, unde stratul circular este mai gros. Acest fapt reflectă adaptarea și specializarea pentru transportul de substanțe alimentare, care au suferit doar transformările actului masticăției.

Fibrele longitudinale, scurtându-se prin contracții, măresc esofagul înaintea bolului alimentar, care este împins de inelul de contracție, format de fibrele circulare de deasupra bolului.

Fibrele longitudinale au traiect descendent și helicoidal, încât în partea inferioară ajung în stratul circular.

D. Tunica externă

Aceasta este reprezentată de peritoneu (anterior drept) și de țesut conjunctiv retroperitoneal (posterior stâng) (9).

Capitolul III

CANCERUL ESOFAGIAN

Introducere

Cancerul esofagian este o boală care necesită o metodă rapidă de diagnostic, în stadii incipiente, și o strategie terapeutică care să asigure absența recidivei, un nivel ridicat de confort pentru pacient și o speranță de viață crescută. Au fost descoperite numeroase gene cu rol în dezvoltarea cancerului esofagian, dar mecanismele de acțiune rămân încă necunoscute. O serie de gene noi au fost găsite și sunt candidate potențiale pentru determinarea prognosticului și a strategiilor terapeutice. Un model tumoral esofagian este necesar deoarece ar ajuta alți cercetători să-și canalizeze studiile pe genele de interes diagnostic cu posibilitatea de dezvoltare mai rapidă a unor mijloace terapeutice.

Cancerul este o maladie complexă care apare ca rezultat al cumulului progresiv de aberații genetice și modificări epigenetice care reușesc să scape de sub controlul celular normal (13). Celulele neoplazice pot avea numeroase aberații genetice dobândite (aneuploidia, rearanjări cromozomiale, amplificări, deleții, recombinații genice, și mutații care duc la pierderea sau câștigul unei funcții). Studii recente (13) au scos în evidență importanța alterărilor epigenetice ale anumitor gene care au drept rezultat inactivarea funcției lor în anumite tipuri de cancer. Aceste aberații conduc la o comportare anormală comună tuturor celulelor neoplazice: creștere neregulată, lipsa inhibiției de contact, instabilitate genomică și potențial metastazant.

Analiza mutațiilor oncogenelor și a genelor supresoare de tumori pot demonstra o asociere specifică între aceste gene și tipul de tumoră. Aceste gene pot fi alterate în timpul carcinogenezei de către diferite tipuri de mutații cum ar fi mutațiile punctiforme, translocațiile cromozomale, amplificările genice sau delețiile. Mai mult, aceste gene pot fi analizate la diferite niveluri – ADN, ARN sau proteine (13).

Celulele tumorale prezintă un număr de caracteristici prin care se diferențiază față de celulele normale:

a) Nu mai sunt dependente de factori de creștere precum celulele normale deoarece sunt capabile să secrete proprii factori de creștere care stimulează propria proliferare, un proces denumit stimulare autocrină, sau deoarece receptorii pentru factorii de creștere de la suprafață sunt modificați în așa fel încât legarea factorilor de creștere nu mai este necesară pentru a stimula proliferarea;

b) Celulele normale necesită un spațiu în mediul extracelular pentru a putea crește acolo unde celulele tumorale se ancorează independent;

c) Celulele normale răspund la prezența altor celule, iar în cultură formează un monostrat datorită inhibiției de contact, iar celulelor tumorale le lipsește acest aspect și deseori se dezvoltă una peste alta sau una sub alta;

d) Celulele tumorale sunt mai puțin aderente față de celulele normale;

e) Proliferarea celulelor normale stagnează la atingerea unei anumite densități, pe când cea a celulelor tumorale continuă.

Epidemiologie și factori etiologici

Cancerul de esofag este un tip de malignitate gastrointestinală cu o instalare discretă și un prognostic modest. Boala afectează predominant grupuri de vârstă înaintată, cu un vârf de incidență între 60 și 70 de ani; se întâlnește rar la copii sau adulți tineri. Incidența este mai crescută la bărbați, cu un raport pe sexe de 4:1. Până nu de mult, cel mai comun tip de cancer de esofag din lume era carcinomul celular scuamos. Adenocarcinomul reprezenta mai puțin de 15% din totalul cancerelor de esofag. Alte tumori maligne ale esofagului, cum sunt sarcoamele, limfoamele, melanoamele primare maligne și carcinomul cu celule mici, sunt foarte rare (14).

Incidența

Incidența cancerului de esofag diferă semnificativ în funcție de regiunea geografică și de rasă. Valorile acestea pot varia și între regiuni din aceeași țară, fapt care demonstrează rolul important al factorilor de mediu sau care țin de alimentație. Pe plan mondial, cea mai mare incidență a cancerului de esofag se observă în Lixian, China, cu peste 130 de cazuri la 100.000 de locuitori. Incidențe crescute ale cancerului de esofag se regăsesc și în regiuni din Iran, Rusia, Columbia, și Africa de Sud. În emisfera vestică, incidența este de aproximativ 5-10 cazuri la 100.000 de locuitori. În Statele Unite, numărul estimativ de cazuri noi de cancer de esofag pentru anul 2000 a fost de 12.300, cu un număr de aproximativ 12.100 de morți (22).

În ultimele două decenii, atât în Statele Unite cât și în Europa de Vest, au fost observate modificări ale frecvenței tipurilor de cancer esofagian. Astfel incidența adenocarcinomului de esofag a crescut, în special la pacienții de sex masculin, iar cea a carcinomului cu celule scuamoase a rămas neschimbată sau chiar a scăzut ușor. Până la începutul anilor 1990, cazurile de adenocarcinom au depășit ca număr cazurile de carcinom cu celule scuamoase și au devenit cel mai întâlnit tip de cancer de esofag la bărbați, reprezentând aproximativ 60% din cancerele de esofag. Această schimbare în epidemiologia cancerului de esofag implică un cumul de factori care nu se pot explica într-un mod simplist prin reclasificarea carcinomului gastric la nivelul cardiei ca adenocarcinom de esofag sau prin justificarea creșterii numărului de cazuri de esofag Barrett (40).

Etiologie

Cei mai importanți factori predispozanți ai cancerului de esofag în țările dezvoltate, conform a numeroase studii, sunt fumatul și consumul de alcool.

În timp ce pentru carcinomul celulelor scuamoase cei mai importanți factori de risc sunt consumul de alcool și de tutun, pentru adenocarcinom principalul factor de risc este reprezentat de esofagul Barrett. Esofagul Barrett, o leziune premalignă cunoscută, este o consecință a refluxului gastroesofagian cronic (BRGE) în care epiteliul scuamos al esofagului distal este înlocuit cu epiteliu columnar de tip intestinal (41).

În anumite regiuni de pe glob, numărul foarte mare de cazuri de cancer de esofag a fost atribuit altor factori cum ar fi cei legați de mediu, precum și de dietă și nutriție. Acestea includ ingestia de alimente fierbinți și de băuturi efervescente, de alimente conservate care conțin nitrați, carența de vitamine esențiale (caroten, riboflavină, vitamina C și E) și minerale (zinc și seleniu), ca de altfel și consumul dezechilibrat de fructe și vegetale. Virusul HPV este de asemenea potențial cauzator al carcinomului celulelor scuamoase la nivelul esofagului (12).

Carcinomul celular scuamos	Fumatul excesiv Consumul de alcool în cantități mari Antecedentelu familiale de cancer dezvoltat la nivelul capului sau gâtului Antecedentelu de radioterapie Esofagitelu cronic (cele mai frecvente fiind în Asia și Africa) Strictura cronică (ingestie de substanțe chimice și iradiere) Tiloza (hiperkeratinizare palmară și plantară) Sindromul Plummer-Vinson Achalazia Dieta/nutriția Deficiența în caroten, vitamine C și E, riboflavină, selenium și zinc Consumul scăzut de fructe și legume Consumul crescut de carne roșie și alimente cu nitrați Consumul de băuturi fierbinți
Adenocarcinomul	Esofagul Barrett și BRGE Obezitatea Fumatul Consumul de alcool Sclerodermia Antecedentele familiale de cancer de colon Medicația: teofilină și β -agoniști (utilizare îndelungată >5 ani)

Tabel 1. Factori de risc pentru apariția cancerului de esofag.

Cancerul de colon și cancerul de sân pot fi asociate cu un risc crescut pentru cancerul de esofag. În fapt, cancerul de colon este asociat cu adenocarcinomul, în timp ce cancerul de sân este asociat atât cu adenocarcinom cât și cu carcinomul de tip scuamos al esofagului. Riscul crescut de carcinom de tip scuamos în cancerul de sân este mai mare la pacienții care au fost supuși radioterapiei ca parte din tratament. Iradierea poate distruge mecanismele de apărare genetice sau poate determina esofagită cronică și îngustarea esofagului, ambele predispunând la dezvoltarea carcinomul de tip scuamos (14).

Îmbunătățirea metodologiei actuale de diagnostic al cancerului esofagian, prin depistarea precoce a leziunilor și tratamentul mini-invaziv individualizat, are drept rezultat final creșterea supraviețuirii și îmbunătățirea calității vieții acestor pacienți prin reducerea morbidității și mortalității. Rezultatele studiilor vor permite identificarea unor gene cu valoare de markeri care vor fi utile în conceperea unor noi scheme de tratament individualizat, în diagnosticul și urmărirea efectelor terapiei aplicate, cât și monitorizarea progresiei tumorale.

Diagnosticul diferențial al cancerului de esofag

Diagnosticul se realizează cu următoarele afecțiuni:

a. Stenoze esofagiene benigne: boala de reflux gastro-esofagian, stenoza postcaustică, esofagita postradică. Anamneza împreună cu tranzitul baritat stabilesc diagnosticul, confirmat prin endoscopie cu biopsie.

b. Diverticul esofagian, diagnosticat prin tranzit baritat.

c. Achalazia, însoțită de disfagie, întâi pentru alimente lichide și apoi pentru cele solide cu scădere ponderală. Pentru stabilirea diagnosticului se vor face analize de laborator, examen cu bariu, endoscopie pentru vizualizarea leziunii și prelevarea unor probe microscopice. De asemenea, se va verifica presiunea de închidere a cardiei și de propulsie a esofagului prin manometrie esofagiană.

d. Prezența unor compresiuni extrinseci: tumori mediastinale, adenopatii, chist hidatic sau tumori pulmonare, gușă plonjantă, anevrism de aortă.

Capitolul IV

TRATAMENTUL CHIRURGICAL AL CANCERULUI ESOFAGIAN

Tratamentul cancerului esofagian se realizează prin tratamentul chirurgical, chimio- și radioterapeutic.

Scopul intervenției chirurgicale oncologice pentru această boală este rezecția tumorii primare și a ganglionilor limfatici de drenaj, reprezentând standardul de aur în tratamentul afecțiunii.

Esofagectomia

Esofagectomia reprezintă principala atitudine terapeutică, fiind o intervenție agresivă cu riscuri importante. La bolnavii cu tumoră rezecabilă, fără semne de adenopatii loco-regionale, metastaze sau contraindicații (tarele cardiorespiratorii (17) și denutriția (18)), chirurgia este prima opțiune (19).

Alegerea tehnicii chirurgicale depinde de mai mulți factori:

- localizarea anatomică a leziunii, cea cervicală fiind grevată de dificultăți tehnice și frecvent se practică intervenții paliative, iar cele din 1/2 și 1/3 inferioară a esofagului pot beneficia mai frecvent de intervenții cu caracter curativ, cele localizate cervical sunt cancere extrem de agresive datorită bogăției rețelei limfatice cervicale (20);
- extinderea loco-regională și la distanță a leziunii, cu stadializarea leziunilor;
- procedeul chirurgical folosit pentru refacerea tranzitului, frecvent cu stomac, mai rar cu colon, existând argumente pro și contra.

Abordarea transtoracică corectă se poate realiza printr-o anastomoză în toracele superior pentru tumorile mai mici, și GEJ (tehnica Ivor-Lewis), sau în gât pentru leziunile mai mari. Abordarea transhiatală evită toracotomia și plasează mereu anastomoza în gât. Rezecția esofagului distal și reconstrucția pot fi deasemeni abordate via partea stângă a pieptului sau prin abordarea toracoabdominală (21).

Esofagectomia este o rezecție radicală cu îndepărtarea esofagului cu limite de 10 cm proximal și distal față de tumoră, ce include esofagul toracic, ductul toracic, vena azygos, pericardul posterior și țesutul moale din mediastinul posterior.

Frecvent se folosește stomacul pentru reconstrucția esofagului. Este ușor de mobilizat, are vascularizație excelentă, și în aproape toate cazurile ajunge la gât și baza limbii. Neo-esofagul poate fi poziționat transtoracic sau retrosternal. Dacă stomacul nu poate fi utilizat datorită unei gastrectomii precedente sau a unei tumori, se poate folosi colon pentru reconstrucție. Se pot folosi toate segmentele colonului, mai frecvent colonul stâng sau drept, cu vascularizațiile lor. Cu cele trei anastomoze necesare pentru refacerea continuității gastro-intestinale, morbiditatea este mai mare, dar rezultatele funcționale sunt excelente (23).

Pacienții cu boală metastatică sau cu tumori în stadiu avansat sunt tratați cu intenție paliativă. Paliatia ar trebui mai întâi îndreptată spre ameliorarea disfagiei și obstrucției esofagiane. Acest lucru poate fi realizat în mai multe moduri, inclusiv radiații paliative, dilatarea endoscopică, stentarea endoscopică prin protezarea sub anestezie generală i.v. sau locală orofaringiană, cu plasarea unei proteze din material plastic, compozit sau un stent metalic autoexpandabil, pe ghidul unui fir metalic sub control radiologic, terapia cu laser endoscopică, sau altă terapie pe

bază de lumină (de exemplu, terapie fotodinamică). Cele mai eficiente sunt stenturile metalice autoexpandabile, ele menținându-și poziția odată cu trecerea timpului și cu creșterea în dimensiuni a tumorii, menținând lumenul permeabil.

Protezele nu pot fi utilizate în cazul tumorilor localizate faringoesofagian, sau a celor de la nivelul esofagului toracic dar care realizează stenoze multiangulare, sau în cazul tumorilor esocardiale. Chimioterapia paliativă are doar un rol limitat în acest cadru și numai un impact marginal asupra supraviețuirii.

OBIECTIVELE STUDIULUI LUCRĂRII DE DOCTORAT

Obiectivul principal al studiului urmărește depistarea precoce a cancerului esofagian prin metode actuale, prin acestea înțelegând aportul modificărilor genetice în această afecțiune.

Desigur, acest lucru, este necesar deoarece sindromul esofagian și mai ales disfagia, sunt relevate clinic tardiv, iar screening-ul pentru tumorile esofagiene nu se practică în țara noastră. Acest lucru poate fi îmbunătățit prin utilizarea pentru stabilirea diagnosticului pozitiv și diferențial, a unor markeri tumorali. De asemenea de o mare importanță prognostică este tipul histopatologic, întrucât neoplasmele esofagului inferior sunt foarte adesea adenocarcinoame fiind neresponsive la tratamente adjuvante, iar cancerule esofagului superior (de origine ectodermică), adesea epitelioame sau carcinoame scuamoase au prognostic mai bun, fiind bine receptive la tratamentul adjuvant.

În momentul actual, se efectuează în întreaga lume investigații moleculare în cancer, în speranța codificării unor protocoale în tratamentele genice.

Studiul nostru se referă la markerii genetici ai cancerelor esofagiene.

2. REZULTATE PERSONALE ȘI DISCUȚII

Capitolul V

ANALIZA DATELOR CLINICE GENERALE

Distribuția pe grupe de vârstă

Pacienții aflați în studiu au avut vârste cuprinse între 42-77 de ani astfel:

2	între 40 și 50 de ani
10	între 50 și 60 de ani
8	între 60 și 70 de ani
3	peste 70 de ani

Distribuția în funcție de sex

A existat o repartitie de 19 de cazuri de sex masculin și 4 de cazuri de sex feminin.

Mediul de proveniență

Există o incidență crescută a cancerului esofagian la pacienții provenind din mediul urban față de cel rural: 17 din mediul urban și 6 din cel rural.

Factori de risc

Alcoolul și fumatul reprezintă factori de risc demonstrați în creșterea incidenței cancerului de esofag, mai ales proximal. Alcoolul alterează absorbția foliaților reducând biodisponibilitatea acestora, iar fumatul crește riscul de apariție a cancerului de 2-3 ori în comparație cu nefumătorii. Dintre cei 23 pacienți diagnosticați cu cancer esofagian, 19 pacienți sunt fumători și 4 nefumători. Dintre aceștia 17 pacienți de sex masculin au fost fumători și 2 paciente au fost fumătoare, iar ca repartitie urban/rural, pacienții de sex masculin au fost 10 din mediul urban și 7 din mediul rural, iar cele 2 paciente fumătoare au fost din mediul urban. Repartiția pe grupe de vârstă a fumătorilor este relativ egală, cu o ușoară creștere la nivelul segmentului cuprins între 60-70 de ani. Referitor la consumul de alcool, au fost întâlniți 19 pacienți care au declarat consumul de etanol, 17 fiind de sex masculin și 2 de sex feminin. În funcție de mediul de proveniență, din mediul urban au fost 8 bărbați și 1 femeie, iar din mediul rural 9 bărbați și 1 femeie.

Diagnosticul de cancer esofagian

Diagnosticul clinic de cancer esofagian se realizează prin prezența sindromului esofagian, în principal prin apariția disfagiei progresive, inițial pentru solide și apoi pentru lichide însoțită de scădere ponderală importantă și chiar de cașexie în absența tratamentului suportiv, perfuzabil sau montării unei gastrostome de alimentație. Majoritatea pacienților s-au prezentat tardiv la medic cu disfagie, cel mai frecvent gradul 3 și 4, mai rar gradul 1 și 2:

- Gradul 1 – 2 pacienți
- Gradul 2 – 4 pacienți
- Gradul 3 – 8 pacienți
- Gradul 4 – 9 pacienți

Durerea esofagiană este prezentă sub formă de pirozis la 4 pacienți, odinofagia la 4 pacienți, durerea retrosternală la 10 pacienți, iar cu altă localizare la 3 pacienți. De asemenea bolnavii au prezentat regurgitație, sialoree, hemoragie, precum și semne de impregnare neoplazică (adenopatii, tuse iritativă cu sau fără răgușeală, durere osoasă și scădere ponderală).

Localizarea tumorilor

Localizarea predilectă a cancerului esofagian pe lotul nostru este:

- a) la nivelul treimii inferioare – 10 pacienți
- b) la nivelul treimii medii – 8 pacienți
- c) la nivelul treimii superioară – 5 pacienți

Analiza tipului histopatologic

Din punct de vedere microscopic, cei 23 de pacienți din lot au prezentat următoarele tipuri de cancer:

- a. 17 carcinoame scuamoase, din care 9 carcinoame spinocelulare, 5 carcinoame cu celule fuziforme și 3 de tip adenoid chistic;
- b. 6 adenocarcinoame, din care 3 adenocarcinoame mucoase difuze, 2 adenocarcinoame în ”inel cu pecete” și 1 adenoscuamos.

Macroscopic, cele 17 carcinoame scuamoase au prezentat următoarele tipuri: 6 au fost ulcero-vegetante, 4 ulcerate, 3 infiltrative (stenozante), 3 ulcero-infiltrative, 1 verucos.

Cele 6 adenocarcinoame au prezentat: 3 tipuri ulcerative, 2 tipuri polipoid-vegetante și 1 infiltrativ.

Distribuția pe stadii TNM

Din analiza lotului pe stadii TNM, se constată că cei mai mulți pacienți au fost diagnosticați în stadiile III și IV.

Stadiul TNM (lotul întreg)	Nr. de cazuri 23	Procent %
Stadiul I (T1N0M0)	1	4%
Stadiul IIA (T2N0M0)	1	4%
Stadiul IIB (T1N1M0)	2	9%
Stadiul IIB (T2N1M0)	2	9%
Stadiul IIA (T3N0M0)	2	9%
Stadiul IIIA (T3N1M0)	3	13%
Stadiul IIIC (T4N0M0)	2	9%
Stadiul IIIC (T4N1M0)	3	13%
Stadiul IV (T4N1M1)	4	17%
Stadiul IV (T3N0M1)	3	13%

Capitolul VI

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Evidențierea modificărilor moleculare la nivelul activării oncogenelor (studii de imunofluorescență)

Pentru realizarea acestei activități au fost desemnați doi markeri moleculari (oncogene): HER2 și EGFR, care au fost analizate în 5 probe de țesut tumoral și 5 de țesut normal de esofag prin imunofluorescență.

HER2/neu (cunoscută și ca **ErbB-2**) este gena codificatoare pentru „Human Epidermal growth factor Receptor 2”. Este membră a familiei de proteine ErbB, fiind o tirozin-kinază implicată în căi de semnalizare pentru creștere celulară și diferențiere. Este o proto-oncogenă localizată pe brațul cromozomal lung 17 (17q21-q22). Cele mai multe studii sunt făcute pe cancerul de sân (24).

Supra-expresia HER2 a fost raportată doar în 7.7% din carcinoamele de esofag și doar 1 din 6 cazuri de adecarcinom de esofag. Activarea *Neu* potențează motilitatea celulelor tumorale, secreția de proteaze, invazia și de asemenea modulează funcția de *checkpoint* a ciclului celular.

În cazurile de cancer de esofag studiate este evidențiată o supra-expresie a HER2 (fig.2), comparativ cu probele de țesut normal provenite de la același pacient (fig.1). În fig. 1-2 sunt prezentate imagini de imunofluorescență pe țesut esofagian provenite de la pacientul 5. HER2 are o dispoziție perimembranară continuă.

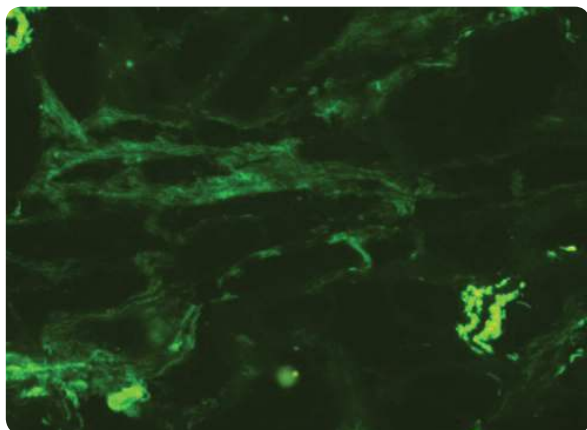


Figura 1. Imunofluorescența pentru HER2/neu în țesut normal de esofag.

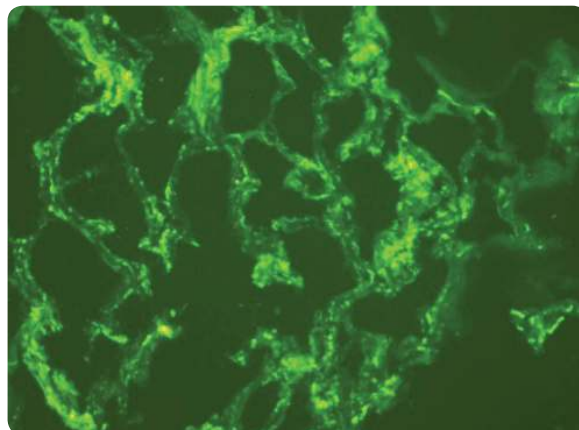


Figura 2. Imunofluorescența pentru HER2/neu în cancer de esofag.

EGFR (epidermal growth factor receptor) denumit și ErbB-1; HER1 la om este un receptor de suprafață, făcând parte din familia receptorilor factorilor de creștere epidermali (EGF-family) care au ca liganzi proteinele extracelulare (36). Este strâns corelat cu receptori tirozin-kinazici: HER2/c-neu (ERB2), HER3(ERB3) și HER4 (ERB4). În cancer, gena EGFR prezintă mutații care afectează atât expresia cât și activitatea sa (37). EGFR este prezent pe suprafața celulelor și este activat prin legarea la liganzi specifici, inclusiv factori de creștere epidermali și TGF α . Activarea EGFR presupune trecerea de la forma de monomer la cea de homodimer, iar prin ligarea altor membri ai familiei ErbB, ca Erb2/Her2/neu, trece în forma de heterodimer. Dimerizarea EGFR

stimulează activitatea intrinsecă a protein tirozin kinazelor, care are ca rezultat autofosforilarea câtorva resturi de tirozină (Y) din domeniul C-terminal al EGFR. Printre acestea Y992, Y1045, Y1068, Y1148 și Y1173. Această autofosforilare determină activarea downstream și semnalizarea altor proteine cu tirozine fosforilate (cu domeniul SH2 de legare al fosfotirozinei). Acestea inițiază cascadele de semnalizare: MAPK, Akt și JNK, care conduc la sinteza ADN și proliferarea celulară. Aceste proteine modulează migrarea, adeziunea și proliferarea celulară.

Mutațiile, amplificările și dereglările de expresie a EGFR sau membrilor familiei din care face parte sunt descrise ca implicați în 30% din totalitatea cancerelor epiteliale (25). Identificarea EGFR ca și oncogenă a condus la dezvoltarea unor terapii anticancerigene țintite direct. Astfel, au apărut Gefitinib (26) și Erlotinib pentru cancerul de plămân și Cetuximab pentru cancerul de colon. Cetuximab și Panitumumab sunt utilizați ca inhibitori ai anticorpilor monoclonali. Anticorpii monoclonali blochează domeniul de legare al liganzilor extracelulari, având acest situs blocat, moleculele semnal nu se mai pot atașa și nu mai pot activa tirozin kinazele.

Supraexprimarea EGFR este o modificare genetică frecventă în leziunile displazice premaligne de esofag scuamos și de asemenea o modificare genetică care apare în stadiile timpurii în celulele canceroase de esofag scuamos (27, 28).

Dispoziția perimembranară continuă a proteinei EGFR și reacția pozitivă a țesutului tumoral de esofag la tratamentul cu anticorp EGFR este evidențiată și în cazul pacienților studiați (fig. 4). În cazul țesuturilor normale de esofag reacția de imunofluorescență a fost negativă (fig. 3).

Prin tehnica de imunofluorescență se pot obține informații care pot permite aprecierea continuității colorării de-a lungul membranelor celulelor tumorale, dar și a numărului de celule imunocolorate, care vor fi utile oncologului în tratamentul anti-EGFR.

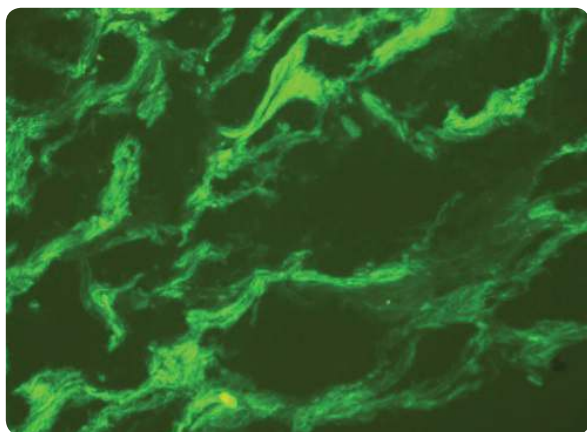


Figura 3. Imunofluorescența pentru EGFR în țesut normal de esofag.

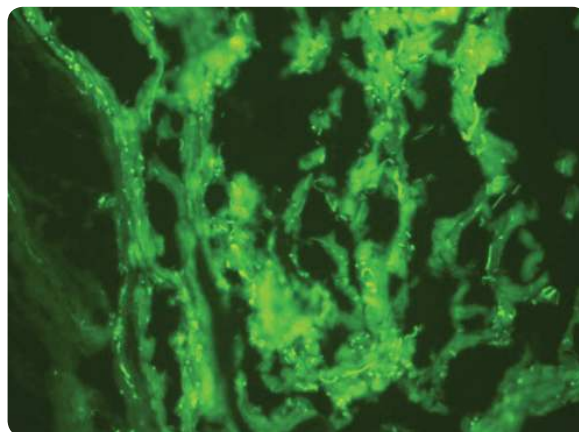


Figura 4. Imunofluorescența pentru EGFR în cazul unui bolnav cu cancer de esofag aflat în studiu

Evidențierea modificărilor moleculare la nivelul inactivării genelor supresoare tumorale (studii de imunofluorescență)

Pentru realizarea acestei activități au fost desemnați doi markeri moleculari (gene supresor tumoral): APC și p53, care au fost analizate în cazurile de țesut tumoral și de țesut normal de esofag prin imunofluorescență.

Adenomatous polyposis coli (APC) denumită și **deleted in polyposis 2.5 (DP2.5)** este o proteină codificată de gena APC, clasificată ca genă supresoare de tumori. Ea este implicată în prevenirea creșterii necontrolate a celulelor, dar și în diviziunea celulară: asigură numărul corect de cromozomi din timpul diviziunii celulare. Activitatea beta-cateninei este controlată de APC prin calea de semnalizare Wnt. Prin reglarea beta-cateninei se inhibă genele care stimulează diviziunea celulară și previne invazia celulară (29).

Polipozele familiale adenomatoase (FAP) sunt cauzate de mutații în gena APC. Majoritatea acestor mutații conduc la producerea de proteină APC anormal de scurtă și nefuncțională. Proteinele APC anormale nu pot suprima creșterea celulară continuă, ceea ce va duce la formarea polipilor, care pot deveni canceroși.

În figura 5 este prezentată o imagine de imunofluorescență făcută pe țesut de esofag normal (la distanță de tumoră) cu expresie proteică APC negativă, pe când în figura 6 este prezentată o supra-expresie a APC în țesut tumoral. Ambele imagini sunt realizate pe țesut provenit de la același pacient diagnosticat cu cancer de esofag de tip scuamos.

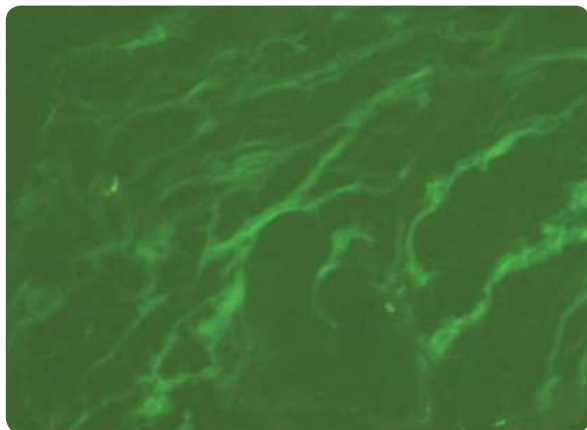


Figura 5. Imunofluorescență pentru APC în țesut normal de esofag.

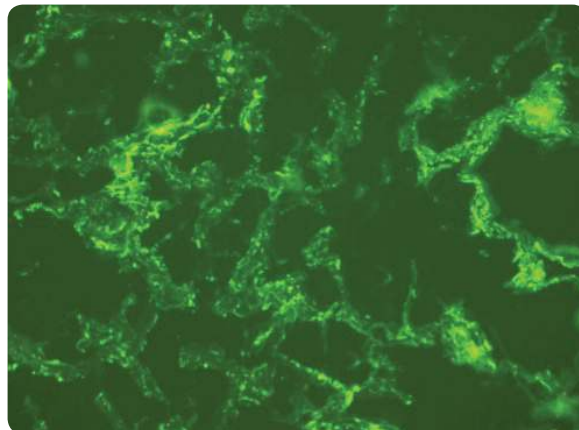


Figura 6. Imunofluorescență pentru APC în cancer de esofag.

Identificarea eventualelor modificări genetice la nivelul procesului de control al ciclului celular (studii de imunofluorescență)

Analiza mutațiilor de la nivelul genelor denumite „mitotic checkpoint” duce la pierderea funcțiilor genelor. Mutațiile de la nivelul genei p53 sunt printre cele mai cunoscute leziuni genetice descrise în cancer. P53 funcționează în complex homotetrameric ca și factor de transcripție care induce expresia genică și poate facilita oprirea ciclului celular, repararea ADN și apoptoza.

O singură proteină p53 mutantă din complexul tetrameric p53 anulează funcția normală a întregului complex. Mai mult, proteinele p53 mutante au un timp de înjumătățire mai mare, decât proteinele p53 sălbatice (fără mutație), aceasta având implicație directă în acumularea de proteine p53 mutante în celulă și activitatea lui p53 normal va fi inhibată. Mărirea concentrației intracelulare de p53 poate fi evidențiată prin imunohistochimie. Numeroase studii de imunohistochimie evidențiază că mai mult de 50% din adenocarcinoamele esofagiene au o pronunțată supra-expresie de p53 (38, 39).

Detecția supra-expresiei p53 în cazurile analizate prin imunofluorescență (figura 8) este corelată cu gradul de proliferare și de diferențiere, prognosticul, și este susținut prin numărul de celule imunomarcate și prin intensitatea marcajului lor. În figura 7 este prezentată o imagine de imunofluorescență făcută pe țesut de esofag normal cu expresie proteică p53 negativă.

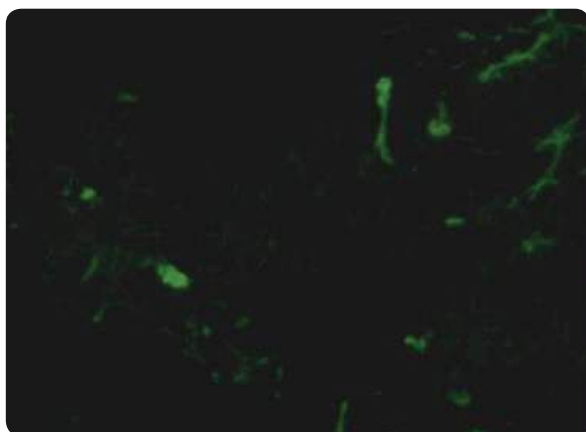


Figura 7. Imunofluorescență pentru p53 în țesut normal de esofag.

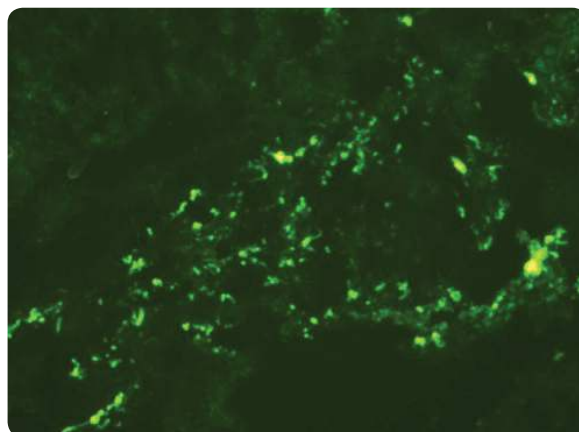


Figura 8. Imunofluorescență pentru p53 în cancer de esofag.

Evaluarea capacității apoptotice a celulelor din diferitele stadii ale tumorii esofagiene (studii de imunofluorescență)

Celulele normale se divid păstrând un echilibru între proliferarea și distrugerea celulară, ceea ce este important în menținerea numărului constant de celule în țesut. O creștere a proliferației celulare și o scădere a apoptozei sau amândouă, produc o creștere necontrolată a numărului de celule, rezultând formarea tumorii.

Apoptoza sau moartea celulară programată este un mecanism responsabil de pierderea celulelor. Apoptoza este un mecanism prin care se îndepărtează celule îmbătrânite sau cele cu defecte (care ar putea interfera cu funcțiile normale ale celulelor sau conduce spre proliferare neoplazică) și se repară ADN. Apoptoza poate fi detectată prin tehnici de imunohistochimie care evidențiază fragmentarea ADN. A fost evidențiată o creștere a ratei apoptozei cu o creștere a severității modificărilor histologice în metaplazia/displazia intestinală și în carcinom, dar și în gradul crescut de displazie Barrett și adenocarcinom (30, 31, 32).

Proto-oncogenul bcl-2 codifică pentru o proteină care blochează apoptoza celulară. Expresia Bcl-2 a fost găsită crescută în esofagitele de reflux, esofagul Barrett nondisplazic și displazie de esofag Barrett de grad scăzut, în procente de 70-100%. Expresia Bcl2 a fost găsită scăzută, chiar absentă în carcinoame (0-40%) și displazie de grad crescut (0-25%), (32,33). Aparent inhibarea apoptozei prin supraexprimarea proteinei Bcl-2 se produce în stadiile timpurii de evoluție a displaziei Barrett spre carcinom, ceea ce are ca rezultat prelungirea ratei de supraviețuire a celulelor și promovarea progresiei neoplazice.

Cercetările realizate, de evidențiere a apoptozei, urmărind nivelul de expresie a Bcl2 nu au evidențiat modificări ale expresiei acestei proteine în țesutul tumoral de la pacienți cu cancer de esofag prin comparație cu țesutul lor normal (fig. 9-10). Putem stabili că în cazurile de tumori maligne esofagiene examinate, cu grade de diferențiere și stadii de invazie diferite, nu avem expresie Bcl2, capacitatea apoptotică fiind sesizabilă mai ales prin metode și tehnici post tratament (de exemplu citostatic).

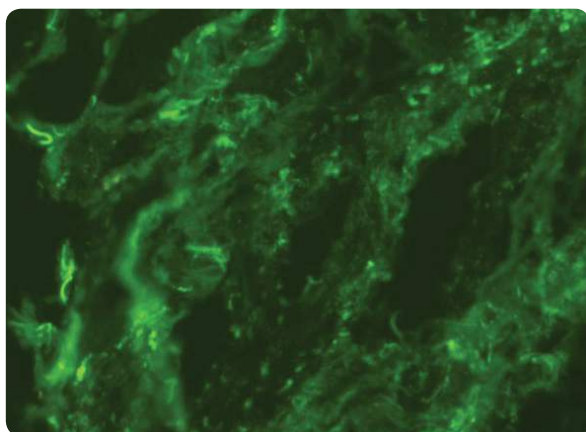


Figura 9. Imunofluorescență pentru Bcl-2 în țesut normal de esofag.

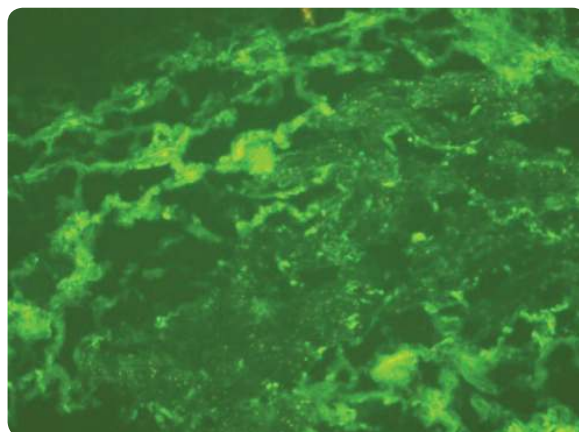


Figura 10. Imunofluorescență pentru Bcl-2 în cancer de esofag.

REZULTATELE OBTINUTE ÎN URMA ANALIZEI DELEȚIILOR ȘI DUPLICAȚIILOR PRIN TEHNICA MLPA

Pentru a putea interpreta corect rezultatele unei analize de MLPA trebuie să ținem cont de mai multe aspecte. Practic analiza pornește de la profilul genetic neprelucrat rezultat în urma migrării și separării produșilor de amplificare pe analizorul genetic ABI Prism 310. Prin prelucrarea acestuia cu ajutorul programului „GeneMapper ID v3.1” se va obține în final amprenta genetică a indivizilor.

O examinare mai riguroasă a profilelor obținute se poate face într-un Excel modificat, denumit Coffalyzer. Inițial, înălțimile și ariile corespunzătoare tuturor peakurilor ale unei singure rulări, a unui singur pacient, rezultate în urma prelucrării în programul GeneMapper ID v3.1, sunt exportate într-un document Excel și abia apoi introduse în programul Coffalyzer. Acest program permite normalizarea fragmentelor separate prin MLPA și prezentat ca un raport al numărului de copii. Acest raport rezultă din împărțirea ariei fiecărui peak la suma ariei tuturor peakurilor unei probe analizate. Raportul relativ al ariei fiecărui peak este apoi comparat cu cel obținut pe probele de ADN control, provenite de la pacienți a căror genă BRCA2 nu a fost modificată.

De asemenea, în cadrul unui singur experiment este necesară rularea a cel puțin 3 probe de ADN control, deoarece programul Coffalyzer realizează și o statistică internă, care permite uniformizarea mai bună a peakurilor control.

Raporturile obținute în urma normalizării, cu valori în jur de 1 (0,8 – 1,2) sunt considerate normale, fără modificări de tipul delețiilor sau duplicațiilor. Sunt considerate deleții atunci când rapoartele sunt mai mici sau egale cu 0,5, și respectiv duplicații, atunci când rapoartele sunt mai mari sau egale cu 1,5. Mai mult chiar, pentru deleție se acceptă chiar și valoarea de 0,6 – 0,7, iar pentru duplicație cea de 1,4 – 1,3, ceea ce este în acord și cu procentul de pierdere de 35 – 40%.

Au fost investigați zece pacienți prin tehnica MLPA, pentru evidențierea unor posibile corelații între mutațiile cromozomiale existente la nivelul genei BRCA2 (deleții sau amplificări) și cancerul de esofag.

Analiza rezultatelor MLPA pornește de la profilul genetic neprelucrat rezultat în urma migrării și separării produșilor de amplificare pe analizorul genetic ABI Prism 310. Prin prelucrarea acestuia cu ajutorul programului „GeneMapper ID v3.1” se obține în final amprenta genetică a indivizilor (Figura 2).

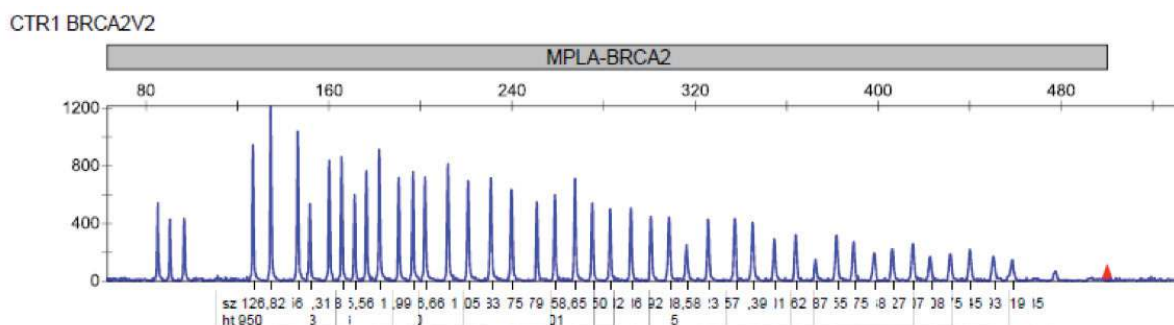


Figura 2. Cromatogramele MLPA în cazul unor probe luate drept control pentru gena investigată BRCA2.

Pentru normalizarea rezultatelor au fost folosite zece probe control. În tabelul 4 este prezentat profilul genetic al genei BRCA2 în cazul fiecărui pacient.

Toți cei zece pacienți au prezentat cel puțin o modificare de tip deleție sau amplificare la nivelul genei BRCA2. Se remarcă o posibilă corelație între existența unor deleții la nivelul exonilor 4 și 5 și cancerul de esofag, această modificare apărând la toți cei zece pacienți studiați. Alte deleții posibil corelate cu dezvoltarea cancerului de esofag au fost evidențiate la nivelul exonilor 23, 24 și 27A în cazul a șase din cei zece pacienți investigați. Amplificări care ar putea fi corelate cu prezența cancerului de esofag se întâlnesc la nivelul exonilor 8 și 10 la șase din cei zece pacienți analizați.

ANALIZA MUTAȚIILOR IDENTIFICATE ÎN GENA P53 LA PACIENȚI CU CANCER DE ESOFAG

Identificarea polimorfismelor la nivelul genei p53 pentru cazurile de cancer de esofag studiate s-au realizat prin reacții PCR cu seturile de primeri desemnați. Testele au fost efectuate pe probe de țesut tumoral, iar rezultatele au fost ulterior verificate prin electroforeză în gel de agaroză 1.7%, obținându-se profile electroforetice.

Pacient	Stagiu tumoral	Polimorfisme	Aminoacid modificat
6	IIa	codon 213 CGA → CGG	Arg → Arg
7	Ib	codon 175 CGC → CAC	Arg → His
8	I	intron 7 + 18437, T/C +18457, T/G	-
11	IV	codon 220 TAT → TGT	Tyr → Cys

Tabel 2. Mutații în gena p53 identificate la pacienți cu cancer de esofag cu diferite stagii tumorale.

Prođușii PCR purificați au fost secvențiați cu analizorul genetic ABI 3130 (Applied Biosystems), obținându-se secvențe atât din probe de țesut tumoral, cât și din sânge. Au fost identificate numeroase polimorfisme nucleotidice astfel că din zece pacienți analizați, patru (40%) au prezentat polimorfisme în gena p53.

În exonul 5 a fost observat un polimorfism în pacientul 7 ce corespunde unei mutații missense punctiforme heterozigote localizată în codonul 175 (CGC → CAC). Codonul normal codifică pentru arginină, codonul modificat codifică pentru histidină. Ambii aminoacizi sunt aminoacizi polari, mutația neafectând polaritatea proteinei.

În exonul 6 au fost identificate două mutații punctiforme heterozigote:

a) una silențioasă în codonul 213 CGA → CGG, mutația fiind găsită atât în proba tumorală cât și în sângele pacientului 6, și aminoacidul codificat de ambii codoni este arginina;

b) o mutație missense în codonul 220 TAT → TGT, în proba de țesut tumoral de la pacientul 11, codonul TAT codifică pentru tirozină, iar codonul TGT pentru cisteină. Cisteina și tirozina sunt aminoacizi neutri, dar cisteina fiind un aminoacid slab polarizat, în timp ce tirozina nu este, poate influența polaritatea proteinei. Alte două polimorfisme sunt evidențiate la intronul 7 al genei în pozițiile +18437, T/C și +18457, T/G, la pacientul 8.

Corelarea datelor genetice cu datele clinice ale pacienților duc la concluzia că modificările din gena p53 apar în stadii incipiente ale cancerului de esofag (I-II). În stadiile mai avansate de cancer se pot asocia și modificări de polaritate ale proteinei, care pot conduce la schimbări de conformație proteică cu alterarea capacității acesteia de răspuns la nivelul tumoral (tabel 2).

Mutațiile din gena p53 (polimorfisme, deleții) sunt printre cele mai comune modificări genetice descoperite în cancerul uman. Mai mult de 85% dintre mutațiile p53 descoperite în cancer sunt mutații missense. În cazul anumitor tipuri de cancer acest tip de mutații sunt asociate cu stadiile tumorale avansate și cu rată scăzută de supraviețuire (34, 35). Mutațiile missense produse *in vivo* pot conduce la substituiri de un singur aminoacid, care poate avea ca rezultat schimbări în conformația proteinei p53. Consecința acestor modificări poate fi contribuția la progresia tumorală și a prognosticului nefavorabil al maladiei (35).

DISCUȚII

Este foarte greu să descoperim un cancer în faza preclinică, majoritatea fiind descoperite tardiv odată cu apariția clinică a disfagiei și imagistic a tumorilor (de obicei endoscopic și prin CT).

Stadiul tumorii este frecvent avansat (III, și mai des IV), bolnavii ajungând târziu să fie consultați și investigați (educație sanitară precară, relație pacient-medic de familie necorespunzătoare, continuarea tratamentului pentru reflux gastro-esofagian fără efectuarea unei endoscopii digestive care ar stabili diagnosticul de cancer esofagian). În faza infraclinică cu semne minore clinice sau chiar în absența semnelor imagistice, investigațiile moleculare sunt extrem de folositoare, pentru că descoperă lotul de bolnavi ce prezintă modificări genetice ce pot duce la apariția neoplaziilor esofagiene (la fel femeile cu neoplasm de sân sunt candidate să facă și la sânul contralateral). Aceste probe genetice, având o acuratețe foarte mare, sunt considerate semnificative și fidele pentru cancerul esofagian, deci în teritoriul incertitudinilor diagnosticării rapide a cancerului esofagian, în teritoriul „border-line”, examinarea genetică este hotărâtoare.

Avantajul major al investigațiilor moleculare duce la intervenții chirurgicale în faza de securitate oncologică. Cancerul esofagian prin poziția acestui organ în trei teritorii (gât, torace și abdomen) prezintă o propagare limfatică în toate aceste teritorii și devine rapid inoperabil deoarece metastazele ganglionare și invaziile locale se produc într-un teritoriu neoperabil (greu abordabil), mediastinul.

Cea de-a doua importanță majoră a investigațiilor moleculare o reprezintă realizarea tratamentului individual al neoplaziilor. Tratamentul clasic presupune realizarea lui în funcție de organul afectat și tipul histo-patologic al cancerului. În funcție de acești parametri există protocoale standardizate permanent actualizate de tratament chimio și radioterapeutic.

Capitolul VII

CONCLUZII

1. Cancerul este o maladie complexă care apare ca rezultat al acumulării progresive de aberații genetice și modificări epigenetice care reușesc să scape de sub controlul celular normal. De asemenea, factorii de mediu joacă un rol important, aproximativ 60-90% dintre cancere se cred a fi cauzate de aceștia. Celulele neoplazice pot avea numeroase aberații genetice dobândite (aneuploidia, rearanjări cromozomiale, amplificări, deleții, recombinații genice, și mutații care duc la pierderea sau câștigul unei funcții). Aberațiile conduc la o comportare anormală comună tuturor celulelor neoplazice: creștere neregulată, lipsa inhibiției de contact, instabilitate genomică și probabilitatea de metastază.

2. În mai multe tipuri de cancer, biomarkerii au îmbunătățit capacitatea noastră de diagnostic, prognostic, tratament și predicție. În general, un biomarker adecvat ar trebui să fie util în definirea și identificarea riscurilor în primele stadii ale carcinogenezei. În plus, biomarkerii pot fi analizați într-un mod non-invaziv și economic și, prin urmare, este de mare valoare să investim în căutarea mai multor biomarkeri prin apariția unor noi discipline, genomica și proteomica. Astfel se pot studia toate genele de la nivelul unei celule sau a unui organism și se pot analiza o serie de proteine.

3. Din analiza parametrilor clinici putem concluziona: incidența crescută la sexul masculin a cancerului esofagian, cu maximum în decada 50-60 de ani, fumatul și alcoolul reprezentând factorii de risc cei mai importanți (mai ales în cazul asocierii lor). Mediul de proveniență urban și localizarea în treimea inferioară sunt preponderente. Adenocarcinomul este mai des întâlnit în raport cu carcinomul scuamos și este frecvent localizat în jumătatea inferioară a esofagului, în timp ce carcinomul scuamos este mai frecvent în cea superioară. Pacienții s-au prezentat în procent mare în stadiile III și IV, mai rar în stadiul II și foarte rar în stadiul I.

4. Chirurgia esofagului prezintă dificultăți tehnico-tactice deosebite, comparativ cu alte organe, datorită poziției sale greu accesibilă și a raporturilor cu organe vitale precum și din cauza necesității mobilizării viscerelor abdominale pentru reconstrucția lui, esofagectomia cu sau fără limfadenectomie asociată cu chimioradioterapia fiind soluția terapeutică optimă. (15)

5. Alegerea tehnicii chirurgicale depinde de mai mulți factori, localizarea anatomică a leziunii, cea cervicală fiind grevată de dificultăți tehnice și frecvent se practică intervenții paliative iar cele din jumătatea și treimea inferioară a esofagului pot beneficia mai frecvent de intervenții cu caracter curativ, extinderea loco-regională și la distanță a leziunii, procedeul chirurgical folosit pentru refacerea tranzitului, frecvent cu stomac, mai rar cu colon, existând argumente pro și contra și nu în ultimul rând de contraindicații (tarele cardiorespiratorii și denutriția) (16).

6. Pe baza datelor din literatura de specialitate au fost selectați următorii markeri molekulari pentru analizele de imunofluorescență:

- EGFR și HER2/neu ca oncogene;
- p53 și APC ca gene supresoare tumorale;
- p53 este o genă al cărui produs proteic este implicat în procesul de control al ciclului celular și a fost foarte utilă pentru identificarea modificărilor genetice la nivelul ciclului celular;
- Bcl2 a fost desemnată pentru evaluarea capacității apoptotice a celulelor din diferitele stadii ale tumorii esofagiene.

7. În cazurile de cancer de esofag de tip scuamos studiate este evidențiată o supra-expresie a EGFR și HER2, comparativ cu probele de țesut normal.

8. Pacienții la care s-a detectat supra-expresia acestor tipuri de oncogene pot fi potențiali candidați pentru tratament citostatic cu ținte moleculare (ex. medicamente anti-EGFR).

9. Supra-expresia p53 detectată în cazurile analizate prin imunofluorescență poate fi corelată cu prognosticul, gradul de diferențiere, gradul de proliferare și se susține prin numărul de celule imunomarcate și prin intensitatea marcajului.

10. Putem concluziona că pentru cazurile de tumori maligne esofagiene luate în studiu și care aveau grade de diferențiere și stadii de invazie diferite, nu avem expresie Bcl2, deoarece după instalarea stării de malignitate celulele dobândesc mecanisme de evitare a apoptozei.

11. Metodele de evaluarea imunofluorescenței expresiei genice pot fi utile în stabilirea și/sau confirmarea diagnosticului tumorilor prezente la nivelul tractului gastrointestinal și în același timp pot fi folosite și pentru selectarea și orientarea strategiilor terapeutice adecvate.

12. S-a aplicat tehnica MLPA pentru investigarea unor posibile corelații între gena de interes selecționată anterior, BRCA2 și prezența cancerului de esofag.

13. În urma investigațiilor au fost descoperite anumite regiuni aparținând acestor gene care ar putea fi corelate cu cancerul de esofag.

14. Este vorba despre existența unor deleții la nivelul exonilor 4 și 5 aparținând genei BRCA2 întâlnite la toți cei zece pacienți investigați pentru această genă, a unor deleții la nivelul exonilor 23, 24 și 27A, întâlnite la șase din cei zece pacienți investigați și a unor amplificări la nivelul exonilor 8 și 10 la șase pacienți.

15. Mutațiile din gena p53 (polimorfisme, deleții) sunt printre cele mai comune modificări genetice descoperite în cancerule umane.

16. Mutațiile missense produse *in vivo* pot conduce la substituiri de un singur aminoacid, care poate avea ca rezultat schimbări în conformația proteinei p53, dacă aminoacidul substituit este înlocuit de unul cu o altfel de încărcare electrică.

17. La pacienții analizați au fost identificate mutații punctiforme în exonul 5, codonul 175, în exonul 6 codonii 213 și 220 și în intronul 7 în pozițiile +18437, T/C și +18457, T/G.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Lupu, B. Cristea, B. Diaconescu, Laura Stroica, **Anatomia Omului** – Cap și Gât, Lucrări practice, 128-130, Ed. Universitara Carol Davila, București, 2010
2. G. Lupu, F. Filipoiu, B. Cristea, Laura Stroica, B. Diaconescu, I. Bulescu, **Anatomia Omului** – Toracele, Lucrări practice, 21-23, Ed. Universitară “Carol Davila”, București, 2013
3. G. Lupu, F. Draghia, Alina Draghia, I. Negoii, Ruxandra Negoii – Anatomie – Aparatul Digestiv, Lucrări practice, 31-38, Ed. Universitară Carol Davila, București, 201
4. Victor Papilian – Anatomia Omului, Vol. II Splanhnologia, Ediția VI, Ed. Didactică și Pedagogică București, 1982.
5. Angelescu N. – Tratat de patologie chirurgicală, București, Editura Medicală; 2001, pag. 1324-1327, 1346-1351, 1357-1358, 1360-1361.
6. Bădăraș I.A. – Fiziologie. București: Editura Universitară “Carol Davila”; 2009, pag. 124-125.
7. Boron WF, Boulpaep EL. – Medical Physiology, 2nd edition. Canada: Elsevier Saunders; 2009, pag. 890-891.
8. Brătucu E. – Manual de chirurgie pentru studenți. București: Editura Universitară „Carol Davila”; 2009, pag. 356.
9. Filipoiu FM. – Aparatul digestiv subdiafragmatic și splină. București: Editura Universitară „Carol Davila”; 2010, pag. 35-38.
10. Guyton AC., Hall JE. – Medical Physiology, 11th edition. China: Elsevier Saunders; 2006, pag. 782-783.
11. Hiroshi M. Raj K. – Physiology of esophageal motility. Nature 2006. Valabil la <http://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo3.html#relatedcontent>. Accesat la 22.09.2013.
12. Freddy Sitas et al, InterSCOPE Study: Associations Between Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus Serological Markers, J. Natl Cancer Institute 2012; 104, 147-158.
13. Boultonwood Jacqueline and Fidler Carrie. 2002. Molecular analysis of cancer Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, New Jersey 07512, pag. 1-7.
14. James H. Grendell
15. Dr. Dan Gavrilu – Chirurgia Esofagului 1957; pag. 30-31.
16. Constantinoiu S. – Revista Chirurgia Vol.105, Nr.1, Ianuarie-Februarie 2010, pag. 7-15.
17. Law SY, Fok M, Wong J. – Risk analysis in resection of squamous cell carcinoma of the esophagus. World J. Surg. 1994; 18(3): 339-46.
18. Peters JH, DeMeester TR. – Esophagus and diaphragmatic hernia. In: Principles of Surgery, Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, editors. Ed. McGraw-Hill; 1994. p. 1043-1122.
19. Sugarbaker DJ, DeCamp MM, Liptay MJ. – Surgical procedures to resect and replace the esophagus. In: Maingot's Abdominal Operations, Zinner MJ, Schwartz SI, Ellis H, editors. Appleton & Lange; 1997. p. 885-912.
20. Urshel JD. – Esophageal cancer. In: Chang AE, Ganz PA, Hayes DE, editors. Oncology - an evidence based approach New York: Springer; 2006. p. 664-679.
21. Law SY, Fok M, Wong J. – Pattern of recurrence after oesophageal resection for cancer: clinical implication. BrJ Surg. 1996; 83: 107-111.
22. Elias FH Jr. – Standard resection for cancer of the esophagus and cardia. Surg Oncol Clin N Am. 1999; 8: 279- 294.

23. **Miron L, Marinca M.** Cancerul esofagian. În: Miron L, editor. *Terapia oncologică– opțiuni bazate pe dovezi*. Iași: Editura Institutul European; 2008. p. 169-181.
24. **Schroeder, Joyce A; Adriance Melissa C, McConnell Elizabeth J, Thompson Melissa C, Pockaj Barbara, Gendler Sandra J** (2002). "ErbB-beta-catenin complexes are associated with human infiltrating ductal breast and murine mammary tumor virus (MMTV)-Wnt-1 and MMTV-c-Neu transgenic carcinomas". *J. Biol. Chem. (United States)* 277 (25): 22692–8.
25. **Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA** (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *N. Engl. J. Med.* 350 (21): 2129–39.
26. **Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M'** (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy". *Science (journal)* 304 (5676): 1497–500.
27. **Shimada, Y., Imamura, M., Watanabe, G., Uchida, S., Harada, H., Makino, T., and Kano, M.** (1999) *Br. J. Cancer* 80, 1281–1288.
28. **Mandard, A. M., Hainaut, P., and Hollstein, M.** (2000) *Mutat. Res.* 62, 343–353.
29. **Eklöf Spink, K; Fridman S G, Weis W I** (2001). "Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex". *EMBO J.* 20 (22): 6203–12.
30. **Soslow RA, Remotti H, Baergen RN, et al.** (1999), Suppression of apoptosis does not foster neoplastic growth in Barrett's esophagus. *Mod Pathol*; 12:239 –250.
31. **Wetscher GJ, Schwelberger H, Unger A, et al.** (1998); Reflux-induced apoptosis of the esophageal mucosa is inhibited in Barrett's esophagus. *Am J Surg* 176:569 –573.
32. **Katada N, Hinder RA, Smyrk TC, et al.** (1997); Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Arch Surg*; 132:728 –733.
33. **Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, et al.** 1999, Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep*; 6:877– 882.
34. **U. Manne, R. B. Myers, C. Moron, R. B. Poczatek, S. Dillard, H. Weiss, D. Brown, S. Srivastava, W. E. Grizzle,** Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J. Cancer*, 74 (3), 346-358, 1997.
35. **V. R. Katkoori, XuJia, Chandrakumar Shanmugam, Wen Wan, S. Meleth, H. Bumbers, W. E. Grizzle, U. Manne,** Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism differs with race in colorectal adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.*, 15, 2406 – 2416 (2009).
36. **Hayes D.F. and Thor A. D.** (2002), cERB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin.Oncol.* 29: 231-245.
37. **Santin AD, Bellone S, Roman JJ, McKenney JK, Pecorelli S.** (2008). "Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu". *Int J Gynaecol Obstet* 102 (2): 128–31;
38. **Mandard, A. M., Hainaut, P., and Hollstein, M.** (2000) *Mutat. Res.* 62, 343–353.
39. **Markowitz SD, Bertagnolli MM** (2009). "Molecular basis of colorectal cancer". *N. Engl. J. Med.* 361 (25): 2449–60.
40. **Jun Wang, Jin-Ming Yu, Shao-Wu Jing, Yin Guo, Ya-Jing Wu, Na Li, Wen- Peng Jiao, Li Wang, Yan-Jun Zhang,** (2014), Relationship between EGFR Over-expression and Clinicopathologic Characteristics in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: A Meta-analysis, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (14), 5889-5893.
41. **Kenneth K. Wang, Ganapathy Prasad, Jianmin Tian,** Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection in esophageal and gastric cancers, *Curr Opin Gastroenterol*, 2010, 26(5): 453–458. doi:10.1097/MOG.0b013e32833e4712.