

EVALUAREA IMUNOHISTOCHEMICA SI MOLECULARA A EXPRESIEI COX2 IN ADENOCARCINOMUL DE JONCTIUNE ESOGASTRICA SI LEZIUNILE PRECURSOARE IN CONTEXTUL ANATOMO-CLINIC

Cristina Iosif¹, Carmen Ardeleanu¹, Diana Ene¹, Rodica Birla², P. Hoara²,
Cristina Ganda², P. Surugiu², N. Copca³, S. Constantinoiu².

1. INCD „Victor Babes”, Bucuresti

2. Clinica de Chirurgie Generala si Esofagiana Sp. „Sf. Maria”
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” Bucuresti

3. Clinica II Chirurgie, Sp. „Sf. Maria” Bucuresti

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR EXPRESSION OF COX2 IN ESOPHAGOGASTRIC JUNCTION ADENOCARCINOMA (EGJAC) AND PREMALIGNANT LESIONS CORELATED WITH CLINICAL DATAS (Abstract): The aim of our study was to evaluate the expression of COX2 by immunohistochemical (IHC) and molecular methods on biopsies from patients with esophagitis, Barrett's esophagus (BE) and EGJADC and to correlate these findings with semnificative clinical datas (manometry, ph monitoring, medical and surgical tratament effects). We have evaluated by endoscopy with biopsy and IHC for COX2 , esophageal manometry and 24h pH monitoring 25 esophagitis and 21 BE. 54 EGJADC were tested by IHC for COX2 expression and also by RT-PCR on fresh tumoral tissue. Our results suggest that COX2 expression was correlated with manometry, ph monitoring and histopatholigical aspects. All EGJADCs tested for COX2 were positive but there was no statistical correlation with histologic type, grading and pTNM stage.

KEY WORDS: ESOPHAGOGASTRIC JUNCTION ADENOCARCINOMA, COX2, ESOPHAGEAL MANOMETRY, PH MONITORING, RT-PCR, IMMUNOHISTOCHEMISTRY.

Corespondență: Dr. Cristina Iosif, Clinica de Chirurgie Generală și Esofagiană, Spitalul Clinic Sf. Maria, Bd-ul Ion Mihalache, nr. 37, sector 1, București*.

INTRODUCERE

Ciclooxigenazele sunt implicate în patogeneza unor tumori maligne umane, iar beneficiul terapeutic al inhibitorilor COX2 a fost demonstrat. Supraexpresia COX2 a fost demonstrată la pacienții cu esofag Barrett (EB) și adenocarcinom (AC) esofagian [1-5]. Administrarea de inhibitori de COX2, selectivi sau neselectivi, asociată cu antiacide ar putea fi o strategie promițătoare de prevenție a malignizării esofagului Barrett [2,5].

MATERIAL SI METODA

Au fost investigați prin endoscopie digestiva superioara (EDS) cu biopsie, manometrie si ph-metrie esofagiana pe 24 ore, 25 de pacienți cu esofagită și 21 pacienți cu esofag Barrett internați în Clinica de Chirurgie Generală și Esofagiană a Spitalului

* received date: 01.10.2010

accepted date: 14.10.2010

Clinic „Sf. Maria” București. Esofagita a fost definită endoscopic ca prezența de eroziuni liniare sau confluențe la nivelul esofagului distal.

La pacienții cu esofag Barrett au fost prelevate biopsii din cele 4 cadrane, la fiecare 2 cm. Aspectul endoscopic sugestiv pentru EB a fost verificat histopatologic pentru prezența metaplaziei intestinale folosind colorația uzuală hematoxilină-eozina (HE) (Fig. 1) și colorația specială Albastru-Alcian pH 2,5. Pacienții cu simptomatologie de reflux dar fără modificări vizibile endoscopice au fost definiți ca având boală de reflux non-erozivă. Biopsiile recoltate endoscopic de la pacienții cu esofagită și EB au fost evaluate ulterior imunohistochimic (IHC) pentru expresia COX2 (Fig. 2, 3).

Lotul de studiu a cuprins și 54 de cazuri de AC de joncțiune eso-gastrică operate la care s-a făcut evaluarea imunohistochimică și moleculară a expresiei COX2 pe țesut tumoral arhivat (Fig. 4) și respectiv proaspăt, recoltat intraoperator (Fig. 5, 6).

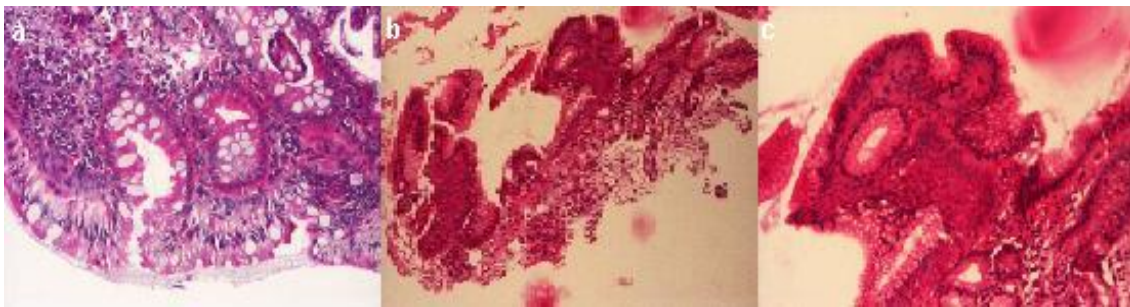


Fig. 1 Esofag Barrett

a metaplazie intestinală cu celule caliciforme și displazie negativă, HE, 10x b. Mucoasă de tip Barrett, displazie incertă, HE, 4x c. Mucoasă de tip Barrett cu displazie low-grade, HE, 4x.



Fig. 2 Esofagită

a COX2 pozitiv - IHC, 4x b. COX2 pozitiv - IHC, 10x c. COX2 pozitiv, 4x

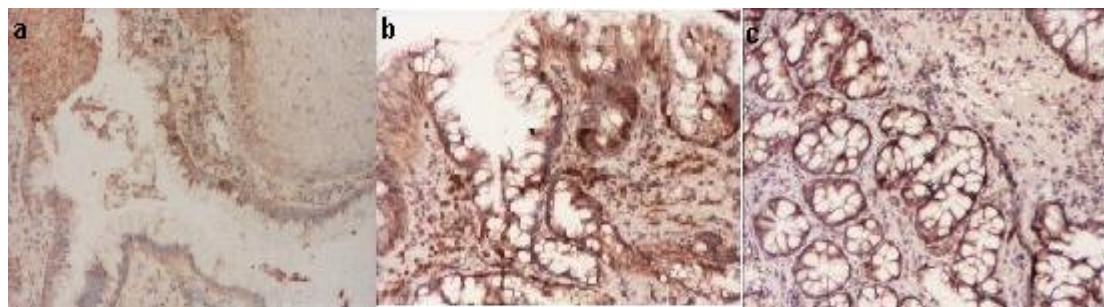


Fig. 3 Esofag Barrett

a. COX2 pozitiv zonal 1+, IHC 4x b. COX2 pozitiv 2+, IHC, 4x c. COX2 pozitiv 2+, IHC, 10x

Metoda imunohistochimică: S-a utilizat metoda IHC indirectă trisdială AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDAZA (ABC) descrisă de Hsu SM et al în 1981 [6], modificată de Bussolati și Gugliotta în 1983 [7].

Prin **metode de biologie moleculară (RT-PCR)** a fost verificată prezența ARNm pentru COX2 pe grupul de adenocarcinoame. Extracția ARNm din probele de țesut proaspăt s-a făcut utilizând reactivul TRI-REAGENT (SIGMA). Verificarea electroforetică a ARN-ului s-a făcut prin încărcarea a 10μl ARN în gel de agaroză 1%. Vizualizarea celor două benzi corespunzând ARNr 28S și 18S a demonstrat reușita extracției.

Reacția de revers-transcriere: ARN-ul obținut anterior s-a utilizat ca matriță în reacția de revers-transcriere realizată cu ajutorul kitului SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, cat.no.18080-051).

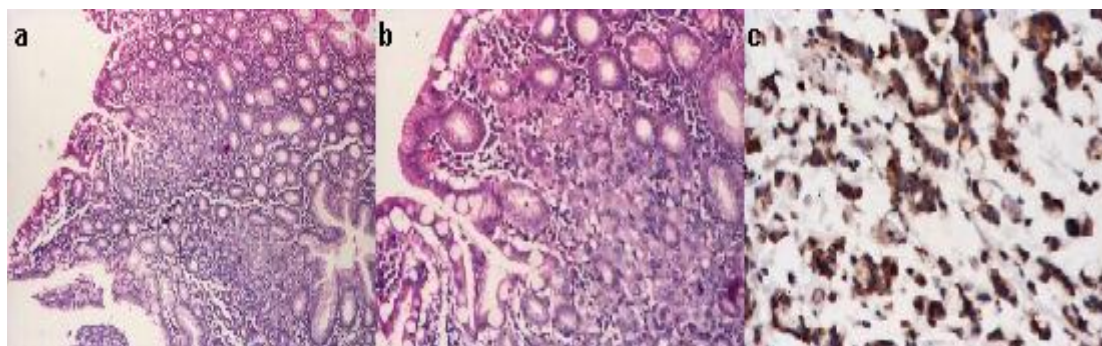


Fig. 4 Carcinom intramucos multifocal cu celule izolate la joncțiunea eso-gastrică, dezvoltat pe metaplazie intestinală (EB)
a (HE, 4x) și b (HE, 10x) c. Expresia IHC a COX-2 în celulele mucinoase din adenocarcinom, 10x (reacție pozitivă 3+).

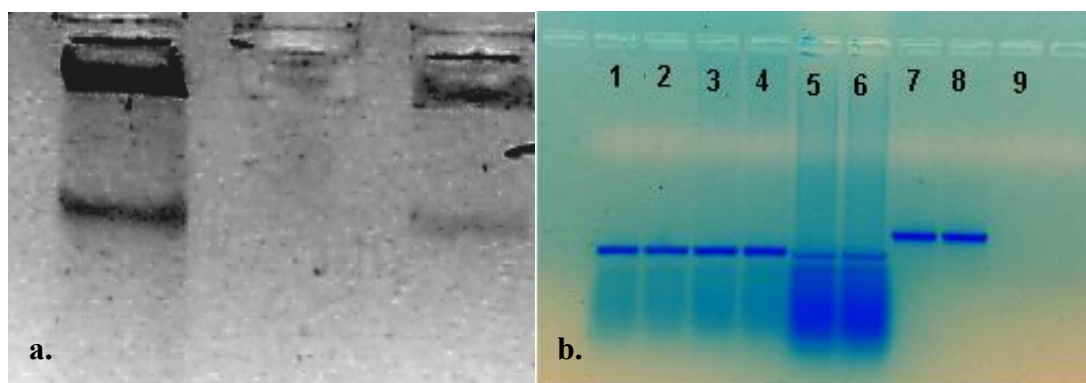


Fig. 5 a. Extracție ARN – electroforeză în gel de agaroză 1%; b. Verificarea electroforetică a reacției PCR pentru COX-2 - godeu 1, 2,3,4- cazuri intens pozitive; godeu 5,6- cazuri slab pozitive (dimensiune fragment de interes 203pb), godeu 7,8 control pozitiv (dimensiune fragment: 280pb), godeu 9- control negativ

Reacția de amplificare: Pentru amplificarea COX-2 s-au utilizat primeri prefabricați: Human COX-2 PCR Primer Pair (R&D Systems, cat.no. RDP-290-025). Dimensiunea produsilor: 203 pb (cDNA), 692 pb (ADN genomic), 280pb (control pozitiv).

Mixul pentru amplificare este alcătuit din: proba de analizat (o mica cantitate din cDNA obținut anterior), amestecul celor doi primeri, Taq polimeraza (GoTaq), clorura de magneziu, mix de nucleotide, și tampon. Pentru reacția de amplificare a fost folosit termocyclerul Perkin Elmer. Evidențierea materialului amplificat a fost făcută prin electroforeza în gel de agaroză 2%, în plan orizontal. Identificarea fragmentului obținut s-a făcut comparând migrarea cu a unui marker care s-a ales în funcție de mărimea fragmentului amplificat, de structura primerilor și de DNA-ului gazdei.

Manometria esofagiană: Toți pacienții au efectuat manometrie esofagiană convențională. A fost localizat și măsurat sfîcterul esofagian inferior (SEI). Punctul de inversiune respiratorie a fost determinat și folosit ca punct de referință pentru măsurarea SEI. Datele obținute au fost transferate pe un computer și au fost analizate folosind un software special (Phoenix V3, Albyn Medical Ltd). Au fost studiate amplitudinea, durata și propagarea undelor peristaltice esofagiene și lungimea totală, lungimea abdominală și presiunea medie a SEI. Am defint un SEI incompetent când au fost prezente unul sau mai multe din următoarele criterii: lungime totală < 2 cm, lungime abdominală < 1 cm, presiune medie < 6 mmHg.

PH-metria esofagiana: S-a efectuat monitorizarea pe 24 ore a pH-ului esofagian folosind un electrod de pH conectat la un aparat digital portabil de înregistrare a datelor (iPh Longterm pH Metry Recorder, Standard Instruments GmbH, Germany). Refluxul acid patologic a fost defint de prezența unui pH < 4 în esofagul distal pentru mai mult de 4,4% din timpul examinat.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Imunohistochimic, expresia COX2 a fost pozitivă în 18/25 esofagite (Fig. 2), 15/21 cazuri cu esofag Barrett (Fig. 3) și 8/13 cazuri cu aspect endoscopic normal dar cu funcție esofagiană modificată.

În adenocarcinoame (n=54) expresia COX2 a fost constant pozitivă cu grade variate de intensitate: 1+ pozitivitate focală, citoplasmatică, <15% din celule tumorale (n=14); 2+ pozitivitate citoplasmatică și membranară - 15-50% din celule tumorale (n=26); 3+ pozitivitate difuză, intensă, membranară și citoplasmatică >50% din celule tumorale (n=14) (Fig. 4c).

Prin reacția de amplificare s-au obținut benzi corespunzătoare ARNr 28S și 18S pentru 13 din cele 15 cazuri studiate.

Din cele 13 cazuri au fost pozitive pentru prezența ARNm COX2, 12 cazuri. Pentru aceste cazuri s-a urmărit detectarea intensității benzilor utilizând aceeași cantitate de ARN ca matriță.

Prelucurarea statistică a datelor a condus la concluzia că expresia COX2 (-,+,++,+++) diferă pe cele trei loturi studiate: esofagită, esofag Barrett, adenocarcinom. (Test Likelihood Ratio; p = 0,0025).

Analiza statistică nu a relevat nici o asociere semnificativă între valoarea expresiei imunohistochimice a COX2 și aspectul morfologic (metaplazie intestinală, prezența/absența displaziei) în cazurile de EB și nici în adenocarcinoame unde s-a evaluat acest parametru (Fig.6a) față de subtipul histologic, gradding și stadiul pTNM.

În ceea ce privește corelarea tulburărilor de kinetică esofagiană cu nivelul inflamației la pacienții cu boala de reflux sau esofag Barrett aflați în studiu am constatat că refluxul acid se asociază cu o marcată deteriorare a kineticii esofagiene demonstrată manometric și cu o expresie crescută a COX2 (Fig.6b), demonstrată imunohistochimic. (testul Fisher -asocierea între manometrie anormală și COX pozitiv, $p = 0.0066$).

Eficiența suprimării refluxului acid prin terapii medicale, chirurgicale, țintite antiCOX2 la pacienții cu esofag Barrett s-a obiectivat prin evaluare posterapeutică clinică, endoscopică, pH-metrică, manometrică, histologică și imunohistochimică pentru COX2 [8].

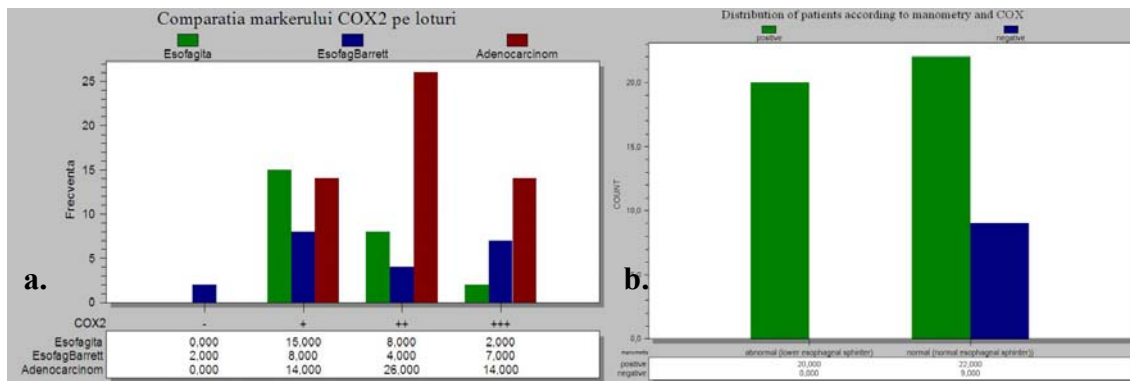


Fig. 6 Corelații statistice ale COX2

a. Expresia COX2 pe grupe de leziuni (esofagite, EB, AC); b. Corelarea expresiei COX2 cu aspectele manometrice.

Toți pacienții cu boală de reflux gastro-esofagian (BRGE) și esofag Barrett au primit tratament timp de 3 luni cu IPP 40 mg/zi, doză unică dimineața. Pacienții cu esofag Barrett și COX2 pozitiv au primit asociat medicație antiCOX2 (Celebrex®).

După 3 luni, pacienții au fost reevaluați clinic și endoscopic. Trei pacienți cu EB au continuat să acuze simptomatologie de reflux, leziunile endoscopice fiind nemodificate față de examenul precedent. Doi dintre aceștia aveau sfincter esofagian inferior (SEI) incompetent și s-a practicat fundoplicatură Nissen. Cei doi pacienți cu esofagită și ulcer esofagian, la endoscopie au prezentat vindecarea ulcerului cu persistența leziunilor de esofagită și a simptomatologiei. 19 pacienți au raportat din punct de vedere clinic dispariția simptomatologiei, iar la endoscopie s-a observat absența leziunilor de esofagită. Din cei 5 pacienți care au continuat să prezinte simptome de reflux sau modificări endoscopice și aveau un SEI incompetent, 3 au beneficiat de intervenție chirurgicală, fundoplicatură Nissen. Ceilalți pacienți cu manometrie normală au primit o doză dublă de IPP cu remisia simptomatologiei clinice la 3 luni.

La supravegherea endoscopică a pacienților cu esofag Barrett sub tratament medical sau post fundoplicatură nu am constatat regresia lezională morfologică în condițiile normalizării pH-metriei și manometriei esofagiene. De asemenea, la pacienții cu EB cu expresie COX2 pozitivă în condițiile suprimării refluxului acid și sub tratament antiCOX2 nu am constatat la 3 luni modificarea expresiei IHC a COX2.

Studiile de manometrie esofagiană la pacienții cu esofag Barrett relevă cel mai frecvent o scădere importantă a presiunii în SEI, de aceea, acești pacienți sunt predispuși la reflux gastroesofagian [9]. De asemenea, se întâlnește o contractilitate esofagiană scăzută, ceea ce întârzie clearance-ul conținutului iritativ din esofag.

Tranzitul esofagian este semnificativ mai încetinit la cei cu esofag Barrett [10]. Manometria corpului esofagian poate detecta ineficiența clearance-ului esofagian prin analiza amplitudinii și vitezei de propagare a undelor peristaltice. La acești pacienți se observă unde peristaltice de joasă amplitudine ce pot explica parțial clearance-ul esofagian alterat [11,12].

Studii recente pe loturi experimentale au arătat că inhibarea COX2 reduce apariția cancerului esofagian prin scăderea angiogenezei și a proliferării epiteliale precum și prin stimularea apoptozei celulelor epiteliale care au suferit mutații genice. Supraexpresia ciclooxygenazei-2 (COX-2) este frecvent întâlnită la pacienții cu adenocarcinom pe esofag Barrett, iar studii recente pe loturi experimentale au arătat că inhibarea COX-2 prin utilizarea inhibitorilor selectivi sau nonselectivi (Aspirina) ar reduce apariția neoplaziei. Inhibitorii selectivi și nonselectivi COX2 reduc inflamația și activitatea COX2, având un rol preventiv în malignizarea esofagului Barrett [4]. Chemoprevenția cu inhibitori ai pompei de protoni și inhibitori COX2 este justificată de scăderea incidenței adenocarcinomului și a mortalității în această afecțiune.

CONCLUZII

EDS cu biopsie și evaluare histopatologică oferă cele mai corecte date asupra gradului și riscului evolutiv al leziunii.

Prezența unui SEI incompetent poate fi o cauză a unui răspuns mai slab la tratamentul medical și poate fi un factor de luat în considerare pentru stabilirea indicației tratamentului chirurgical. Intensitatea crescută a expresiei COX2 paralel cu evoluția *esofagită – EB – adenocarcinom* susține implicarea acesteia în progresia leziunii spre cancer, rolul ei ca biomarker al injuriei mucoasei esofagiene induse de refluxul acid patologic, precum și ca potențială țintă pentru terapie.

BIBLIOGRAFIE

1. Stein HJ, Barlow AP, DeMeester TR, Hinder RA. Complications of gastroesophageal reflux disease. Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. *Ann Surg* 1992; 216(1): 35-43.
2. Konturek PC, Nikiforuk A, Kania J, Raithel M, Hahn EJ, Muhldorfer S. Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(7-8): 1075-1083.
3. Banerjee AG, Gopalakrishnan VK, Bhattacharya I, Vishwanatha JK. Deregulated cyclooxygenase-2 expression in oral premalignant tissues. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1(14): 1265-1271.
4. Fennerty MB, Triadafilopoulos G. Barrett's-related esophageal adenocarcinoma: is chemoprevention a potential option? *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(8): 2302-2305.
5. O'Riordan JM, Abdel-Iatif MM, Ravi N, McNamara D, Byrne PJ, McDonald JS, Kelling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(6): 1257-1264.
6. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol*. 1981; 75(6): 816-821.
7. Bussolati G, Gugliotta P. Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC). *J Histochem Cytochem*. 1983; 31(12): 1419-1421.
8. Griffith Pearson F, Cooper DJ, Deslauriers J, Ginsberg JR, Hiebert AC, Patterson GA, Urschel CH. *Esophageal Surgery*. 2nd ed. Churchill Livingstone, 2002: p. 158-88; p. 245-255.
9. Pandolfino JE, Kahrilas PJ; American Gastroenterological Association. AGA technical review on the clinical use of esophageal manometry. *Gastroenterology*. 2005; 128(1): 209-224.
10. Spechler JS. Barrett's esophagus. *GI Motility online (2006) doi: 10.1038/gimo44*

11. Campos GM, Peters JH, DeMeester TR, Oberg S, Crookes PF, Mason RJ. The pattern of esophageal acid exposure in gastroesophageal reflux disease influences the severity of the disease. *Arch Surg.* 1999; 134(8): 882-887.
12. Lee R, Mittal R. Heartburn and esophageal pain. *GI Motility online (2006) doi: 10.1038/gimo75.*