

Scuola di Dottorato in scienze chirurgiche e tecnologie
diagnostico-terapeutiche avanzate.

Università degli Studi di Napoli Federico II

L'endomicroscopia confocale laser nello studio delle lesioni
neoplastiche colo-rettali.

Tutor: Prof. Giovanni D. de Palma

Candidato: Dr. Francesca Salvatori

L'endomicroscopia confocale laser (CLE) è una strumentazione endoscopica di recente introduzione che rende possibile la visualizzazione di immagini in tempo reale ad alta magnificazione della mucosa gastrointestinale in corso di endoscopia. Tale strumentazione consente all'endoscopista di visualizzare in-vivo l'istologia dell'epitelio mucoso con le sue strutture cellulari e subcellulari.

L'elettromicroscopia confocale offre quindi la possibilità di una valutazione simultanea endoscopica ed endomicroscopica, con analisi delle componenti cellulari, dell'architettura vascolare e connettivale della mucosa esaminata. Le attuali potenziali applicazioni di questa tecnica sono enormi ed includono quasi tutti i casi in cui è richiesta l'esecuzione di una biopsia.

Fino ad oggi, infatti, l'esame endoscopico ha sempre e comunque avuto bisogno di una conferma istologica della natura di una lesione sospetta; l'endoscopia consente l'identificazione di aree sospette che vengono sottoposte a biopsia o rimosse endoscopicamente. Tuttavia ci sono diversi svantaggi che sono associati con il prelievo di biopsie endoscopiche, inclusi sanguinamento e infezioni. Biopsie non rappresentative possono

escludere ampie porzioni di tessuto portando a sottostimare la diagnosi. L'esecuzione di biosie random inoltre è spesso molto dispendiosa in termini di tempo.

Numerose tecniche sono state introdotte nella pratica clinica nel tentativo di superare tali limiti e di aumentare il potere diagnostico dell'endoscopia convenzionale, quali la cromoendoscopia, narrow banding imaging (NBI), l'endoscopia ad alta risoluzione e magnificazione.

Tutte queste nuove tecnologie forniscono immagini endoscopiche potenziate che possono predire l'istologia della mucosa esaminata e guidare le biopsie su aree rappresentative della mucosa. Queste nuove strumentazioni vengono a volte chiamate "biopsia virtuale" perchè simulano immagini convenzionalmente visualizzate dall'istologia convenzionale e hanno mostrato di avere una correlazione con l'istologia del tessuto maggiore rispetto all'endoscopia a luce bianca.

L'elettromicroscopia confocale laser ha la potenzialità di avere un ruolo di primo piano nell'esame endoscopico in particolare nella diagnosi precoce di neoplasie nei programmi di prevenzione secondaria, così come nella ottimizzazione del trattamento endoscopico.

Il cancro coloretale è ancora oggi una delle neoplasie più comuni nel mondo occidentale e la seconda causa di morte per neoplasia nell'Unione Europea. La diagnosi precoce è la chiave per migliorare la prognosi di questa patologia.

La colonscopia è il cardine principale della diagnosi di lesioni precancerose, che possono essere così rimosse endoscopicamente prima che diventino invasive. Numerosi studi hanno infatti evidenziato che i polipi adenomatosi e alcuni tipi di polipi serrati sono i precursori primari del cancro colo-rettale.

I polipi iperplastici rappresentano da un terzo a circa la metà di tutti i polipi e non hanno alcuna potenzialità maligna; solo alcuni piccoli polipi iperplastici del colon distale hanno mostrato una potenzialità maligna minima.

Ad oggi la biopsia endoscopica o la rimozione della lesione sono l'unico metodo per determinare la natura di una lesione in corso di endoscopia. Ne consegue che numerose polipectomie sono inutili e che biopsie su aree non sospette possono condurre a sottostimare la diagnosi e che l'esame istologico di biopsie non rilevanti è dispendioso.

Inoltre il prelievo bioptico e le polipectomie, pur avendo un basso rischio di sanguinamento o infezione, sono ancora la causa più

importante di complicità in corso di colonscopia. Sta quindi emergendo il concetto di guidare le polipectomie sulla base di biopsie virtuali della mucosa coloretale, aumentando il potere diagnostico della colonscopia, riducendo i costi e i tempi della diagnosi, così da migliorare l'identificazione precoce della displasia e ridurre la mortalità del cancro colo-rettale.

La elettromicroscopia confocale laser può avere certamente un ruolo nei programmi di screening e sorveglianza per il cancro coloretale consentendo un esame endomicroscopico della mucosa coloretale in corso di endoscopia. Questo studio ha investigato l'uso della elettromicroscopia confocale laser nello studio delle lesioni della mucosa coloretale. Lo scopo dello studio è stato determinare l'applicabilità clinica ed il valore predittivo dell'elettromicroscopia confocale laser nella diagnosi in-vivo di neoplasia colo-rettale in corso di endoscopia.

Materiali e metodi.

Pazienti. Tutti i pazienti che sottoposti a colonscopia per screening o inclusi in programmi di sorveglianza del cancro coloretale mostravano evidenza di lesione mucosa coloretale sono stati inclusi in questo studio.

Tutti pazienti sono stati invitati a sottoscrivere un consenso informato e lo studio è stato sottoposto ad approvazione del Comitato Etico.

Criteri di esclusione sono stati età inferiore a diciotto anni, gravidanza, compromissione della funzione renale e allergia documentata alla fluoresceina.

Procedura e sistema endoscopico.

L'elettromicroscopia confocale laser può essere ad oggi eseguita con due strumentazioni: una integrata in un endoscopio, il sistema confocale Pentax (gastroscoPIO Pentax EG-3870CIK e il colonscoPIO Pentax EC-3870CILK, Pentax, Tokio, Japan) che genera simultaneamente le immagini endoscopiche e quelle

confocali, consentendo l'utilizzo del canale operativo e che può catturare immagini a differenti livelli di profondità da 0 a 250 μm e una che consiste di diversi tipi di sonde, a differente grado di profondità di scansione, utilizzabili con qualunque endoscopio tramite il canale operativo, il sistema confocale Cellvizio (Cellvizio Endomicroscopy System, Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France) .

Tutte le procedure di questo studio sono state eseguite con il Cellvizio Endomicroscopy System con l'utilizzo di un software di ricostruzione ed allineamento delle singole immagini in un'immagine con un più ampio campo di visione che è detto mosaicing. Tale strumento riduce artefatti di movimento e offre una visione del tessuto migliorata.

Tutte le procedure sono state precedute da identificazione delle lesioni con colonscopia a luce bianca tradizionale, a cui è seguita l'esecuzione dell'esame confocale delle lesioni sospette; la definizione di normalità è stata data dalla raccolta di immagini confocali di quattro quadranti di mucosa colonica normale.

Un unico endoscopista esperto ha effettuato tutte le procedure endoscopiche.

La procedura è stata preceduta, come di consueto, da una preparazione intestinale con quattro litri di soluzione ipertonica di polietilenglicole. La somministrazione endovenosa di midazolam (5-10 mg) è stata eseguita su richiesta del paziente allo scopo di ottenere una sedazione cosciente. Al fine di ridurre artefatti di movimento la somministrazione di un bolo di ioscina-N-butil bromide da 10-20 mg per via endovenosa è stata eseguita in tutte le procedure e la sonda confocale è stata ricoperta da uno stabilizzatore endoscopico a contatto con la mucosa intestinale.

L'agente di contrasto utilizzato in tutte le procedure è stata la fluoresceina sodica al 10 % (10 ml ev), somministrata immediatamente prima della scansione confocale.

La sede anatomica e la classe morfologica secondo la classificazione di Parigi di tutte le lesioni identificate sono state registrate.

Le immagini confocali sono state anch'esse registrate in un database elettronico.

Dopo l'esame endoscopico e confocale si è proceduto all'esecuzione di biopsie endoscopiche o a resezione endoscopica delle lesioni.

Le immagini confocali sono state valutate in vivo e successivamente, con l'utilizzo anche di software di elaborazione delle stesse (mosaicing), da un endoscopista esperto utilizzando come pattern chiave per l'interpretazione delle immagini confocali quelli definiti dai criteri di elettromicroscopia confocale modificati di Mainz per la predizione della neoplasia intraepiteliale coloretta. anche la qualità delle immagini è stata registrata come buona, media, scarsa.

Una diagnosi predittiva di natura (neoplastica o non) delle lesioni è stata fatta sulla base dell'esame delle immagini confocali e comparata con la diagnosi istologica eseguita da un patologo dedicato, secondo la classificazione modificata di Vienna della neoplasie epiteliali gastrointestinali.

Un'analisi della concordanza interosservatore è stata eseguita attraverso la valutazione da parte di altri quattro endoscopisti, con un training minimo di almeno 25 procedure, con elettromicroscopia confocale, eseguite, di sessanta immagini confocali, randomizzate a caso, tra 30 immagini di neoplasia e 30 immagini di lesioni non neoplastiche o di mucosa normale.

Analisi statistica

L'analisi statistica ha utilizzato il software SPSS (SPSS, Chicago, USA). Il calcolo della sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo è stato effettuato con intervallo di confidenza del 95%.

Il coefficiente K di Cohen è stato utilizzato per l'analisi della concordanza interosservatore con scala di valori di 0,01-0,02, 0,21-0,4, 0,41-0,6, 0,61-0,8 e di 0,81-1,0 corrispondenti rispettivamente a un grado di concordanza lieve, discreta, moderata, sostanziale e quasi perfetta.

Risultati

Caratteristiche principali dei pazienti.

Abbiamo arruolato 40 pazienti (28 uomini e 12 donne). L'età media al tempo della colonscopia era di 67 anni.

La procedura endoscopica non ha avuto alcuna complicanza in nessun caso e non si sono verificate reazioni allergiche importanti alla fluoresceina sodica. In un piccolo numero di pazienti si è

verificata una blanda discolorazione gialla cutanea e delle urine risoltasi entro la fine della procedura endoscopica o al massimo entro le ventiquattro ore successive.

Classificazione morfologica ed istopatologica delle lesioni.

Abbiamo identificato con l'endoscopia tradizionale un totale di 58 lesioni di cui 36 sessili e 22 peduncolate.

La localizzazione delle lesioni è stata di 5 lesioni nel cieco, 4 nel colon ascendente, 3 nel colon trasverso, 6 nel colon discendente, 28 nel colon sigmoide, 12 nel retto.

La diagnosi istopatologica è stata di adenoma in 34 casi (58,6%) , di polipo iperplastico in 21 casi (36,2%) e di adenocarcinoma in 3 casi (5,17%).

La dimensione media della lesione è stata di 1,2 cm.

La qualità delle immagini è stata classificata come buona o media nell'81% dei casi.

Trentasei di 37 lesioni sono state diagnosticate come neoplastiche attraverso l'analisi delle immagini confocali raccolte. Una di queste lesioni considerata dopo analisi delle immagini confocali polipo ipereplastico, ha mostrato invece il quadro del polipo adenomatoso all'esame istologico.

Diciannove lesioni diagnosticate come non adenomatose all'analisi confocale, sono state confermate essere polipi iperplastici all'istologia convenzionale. In due casi considerati polipi adenomatosi al confocale si sono dimostrati essere polipi iperplastici all'istologia convenzionale.

La sensibilità della metodica è stata del 97,72% e la specificità del 95,23%.

Il valore del coefficiente k di Cohen è stato di 0.85 con una concordanza interosservatore quasi perfetta.

Discussione e conclusioni

L'elettromicroscopia confocale laser con sonda (probe-CLE) è un utile strumento diagnostico che offre la possibilità di visualizzare strutture cellulari e subcellulari senza richiedere l'utilizzo di un endoscopio particolare e può quindi se necessario essere utilizzata per integrare l'esame endoscopico durante le sua esecuzione.

Abbiamo in questo studio dimostrato la sua applicabilità nella pratica clinica e la sua sicurezza; l'uso della fluoresceina è stato ben tollerato da tutti i pazienti.

La fluoresceina ha un profilo di sicurezza elevato ed è utilizzata in oftalmologia da anni.

Inoltre la elettromicroscopia confocale laser ha mostrato un alto grado di accuratezza diagnostica nel distinguere tra lesioni neoplastiche e non; il piccolo numero di pazienti e l'analisi delle immagini da parte di un singolo osservatore sono sicuramente dei limiti di questo studio, anche se i risultati raggiunti sono in linea con i dati della più recente letteratura.

Kiesslich et al. nel 2004 hanno riportato il primo studio sull'uso della elettromicroscopia confocale laser su 42 pazienti analizzando 134 lesioni nella diagnosi di neoplasia intraepiteliale e del cancro colo-rettale durante colonscopia.

Hanno mostrato un alto potere diagnostico della metodica, confermato anche dallo studio di Hurlstone et al. che hanno evidenziato come la elettromicroscopia confocale offra una ottima visualizzazione delle strutture mucosali coloretali consentendo di predire la presenza di neoplasia intraepiteliale con un'accuratezza del 99%.

Buchner et al. hanno anche comparato la cromoendoscopia virtuale (NBI o FICE) con l'elettromicroscopia confocale; dimostrando in un'analisi di 130 polipi colo-rettali una maggiore sensibilità della CLE rispetto a FICE ed NBI con una specificità simile.

E' chiaro che questa tecnologia si avvantaggia molto dell'uso congiunto di altre tecnologie "red flag" a causa della minutezza dell'area che viene scansata: le aree sospette o le lesioni vengono identificate con la cromoendoscopia, NBI o tecniche di autofluorescenza e poi esaminate con l'elettromicroscopia confocale per una conferma di neoplasia intraepiteliale.

Un uso importante può essere anche la valutazione dei margini dopo resezione endoscopica di lesioni voluminose.

Una possibilità di utilizzo è anche nella sorveglianza dei pazienti con IBD, specialmente quelli ad alto rischio per lo sviluppo del cancro colo-rettale, con rettocolite ulcerosa di lunga data e malattia di Chron estesa.

In questi pazienti l'elettromicroscopia confocale ha mostrato di offrire un più alto grado di accuratezza nell'identificazione della displasia e della neoplasia intrapiteliale. In uno studio di Hurlstone ha evidenziato che l'elettromicroscopia confocale può distinguere tra ALM e DALM con grande accuratezza consentendo una rapida selezione dei pazienti candidati alla chirurgia.

Un limite è dato dalla curva di apprendimento per la predizione della neoplasia intraepiteliale necessaria per utilizzare questa metodica anche se un recente lavoro mostra come sia necessaria un'esperienza di poche ore e circa 60 casi per poterla utilizzare con efficienza.

Un altro limite, in particolare della elettromicroscopia confocale con sonda, quella da noi usata in questo studio, è la profondità di penetrazione della scansione ma per risolvere questo problema potranno essere sviluppate nuove sonde con capacità maggiore.

D'altro canto questa tecnica sta dimostrando che potrà certamente avere un ruolo nella diagnosi precoce della displasia e delle neoplasie coloretali sia nei programmi di screening che nella sorveglianza dei pazienti a rischio riducendo la necessità di prelievi biotici inutili e aumentando le capacità diagnostiche della colonscopia convenzionale.

Siamo ancora lontani però dal sostituire l'istologia tradizionale che è ancora il gold standard nella diagnosi di qualunque lesione in corso di colonscopia. Nuovi studi sono necessari per confermare questi dati positivi e per standardizzare l'interpretazione dei quadri endomicroscopici.

Una dei potenziali sviluppi più affascinanti è nel campo dell'immunoendoscopia; si possono utilizzare sonde molecolari fluorescenti per studio morfofunzionale della mucosa intestinale in vivo, ampliando le nostre conoscenze sulla angiogenesi e carcinogenesi.

L'immunoendoscopia ci consentirebbe di migliorare la diagnosi del cancro colrettale identificando precocemente le lesioni e offrendo una valutazione in vivo della risposta ai trattamenti chemioterapici.

Bibliografia

1. Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF.

Confocal laser endomicroscopy.

Gastrointestinale endosc clin N Am 2005; 15: 715-731.

2. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF.

Virtual hystology.

Best Pract Res Clin Gastroenterol 2009; 136,1509-1513.

3. Wallace MB, Fockens P.

Confocal laser endomicroscopy in the in vivo hystological diagnosis of the gastrointestinal tract.

World J Gastroenterology 2009; 15: 5770-5775.

4. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al.

Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo.

Gastroenterology 2004;127(3):706-713.

5. Meining A, Saur D, Bajbouj M, et al.

In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: an examiner blinded analysis.

Clin Gastroenterol Hepatol. Nov 2007;5(11):1261-1267.

6. Wallace M, Lauwers GY, Chen Y, et al.

Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy.

Endoscopy. Aug 4 2011.

7. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al.

Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology.

Cancer J Clin. May-Jun 2008;58(3):130-160.

8. Wallace MB, Fockens P.

Probe-based confocal laser endomicroscopy.

Gastroenterology. May 2009;136(5):1509-1513.

9. Rabeneck L, Paszat LF, Saskin R, Stukel TA.

Association between colonoscopy rates and colorectal cancer mortality.

Am J Gastroenterol. Jul 2010;105(7):1627-1632.

10. Becker V, von Delius S, Bajbouj M, Karagianni A, Schmid RM, Meining A.

Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy:

evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-

to-imaging time. *Gastrointest Endosc.* Aug 2008;68(2):319-323.

11. Wallace MB, Meining A, Canto MI, et al.

The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract.

Aliment Pharmacol Ther. Mar 2010;31(5):548-552.

12. *The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002.*

Gastrointest Endosc 2003;58(Suppl):S3– 43.

13. Sanduleanu S, Driessen A, Gomez-Garcia E, Hameeteman W, de Bruine A, Masclee A.

In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy.

Clin Gastroenterol Hepatol. Apr 2010;8(4):371-378.

14. Buchner AM, Shahid MW, Heckman MG, et al. Comparison of probe-based

confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps. *Gastroenterology.* Mar

2010;138(3):834-842.

15. Shahid MW, Buchner AM, De Melo SW, et al.

Comparison of Real Time Versus Offline-Blinded Accuracy of Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) for Diagnosis of Neoplasia on Colorectal Polyps.

Gastrointestinal Endoscopy. 2010;71(5):AB199-AB199.

16. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al.

The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia.

Gut 2000;47:251–255.

17. Rubio CA, Nesi G, Messerini L, et al.

The Vienna classification applied to colorectal adenomas.

J Gastroenterol Hepatol 2006; 21:1697–1703.

18. Hurlstone DP, Baraza W, Brown S, et al.

In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia.

Br J Surg 2008;95: 636 – 645.

19. Meining A, Saur D, Bajbouj M, et al.

In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: an examiner blinded analysis.

Clin Gastroenterol

Hepatol 2007;5:1261–1267.

20. Becker V, Vercauteren T, von Weyhern CH, et al.

High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video).

Gastrointest Endosc 2007;66:1001–1007.

21. Watanabe O, Ando T, Maeda O, Hasegawa M et al

Confocal endomicroscopy in patients with ulcerative colitis.

J Gastroent Hepatol 2008; 23Suppl 2: 286-290.

22. van Der Broek FJ, van Es JA, van eeden S, Stokkers PC, et al

Pilot study of probe confocal laser endomicroscopy during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis.

Endoscopy 2011; 4(2): 116-122.

23. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J et

Chromoendoscopy guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis.

Gastroenterology 2007; 132:874-882.

24. Hurlstone DP, Thomson M, Brown S, Tiffin N et al

Confocal laser enomicroscopy in ulcerative colitis: differentiating dysplasia associated lesional mass and adenoma like mass.

Clin Gastroent Hepatol 2007; 5: 1235-1241.

25. Gómez V, Buchner A M, Dekker E, van den Broek JC, Meining A, M. W. Shahid MW, Wallace M et al

Interobserver agreement and accuracy among international experts with probe-based confocal laser endomicroscopy in predicting colorectal neoplasia.

Endoscopy 2010; 42: 286-291.