

## MODIFICĂRI ALE REGLĂRII CICLULUI CELULAR ÎN ESOFAGUL BARRETT ȘI ADENOCARCINOMUL ESOFAGIAN

GEORGE SĂRACI<sup>1</sup>, DIANA IONUȚ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinica Medicală III, Cluj-Napoca

<sup>2</sup>Clinica Medicală I, Cluj-Napoca

### Rezumat

*În condițiile maligne și premalignități există o serie întreagă de alterări ale ciclului celular care duc în final la multiplicare celulară clonală necontrolată. De cele mai multe ori, sistemele de control reușesc oprirea diviziunii celulare până în momentul reparației alterărilor genomice, iar în cazul în care nu se reușește aceasta se declanșează apoptoza. Există însă situații când mecanismele de control sunt depășite și celula continuă haotic diviziunea, ceea ce duce la apariția unei populații clonale tumorale. Esofagul Barrett este o condiție fiziopatologică în care, consecutiv injuriei epiteliului normal scuamos, acesta este înlocuit cu epiteliu cilindric, mai rezistent la agresiune, însă cu risc mai mare de dezvoltare a adenocarcinomului esofagian. În esofagul Barrett se înregistrează o gamă largă de anomalii genetice, moleculare, biochimice, citoarhitecturale, imunologice, dar și ale ciclului celular, mai accentuate și mai ample pe măsura creșterii gradului de displazie și a evoluției către starea malignă. Importanța acestora rezidă în faptul că ele apar chiar înainte de modificările fenotipice detectate histopatologic și pot cuantifica riscul evolutiv către adenocarcinom esofagian.*

**Cuvinte cheie:** esofag Barrett, adenocarcinom esofagian, ciclu celular, evenimente moleculare, evenimente genetice.

### CHANGES IN CELL CYCLE REGULATION IN BARRETT OESOPHAGUS AND OESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA

#### Abstract

*In malignant and pre-malignant diseases there is a wide spectrum of cell cycle alterations that finally lead to clonal uncontrolled cell multiplication. Very often, control systems stop cell multiplication till the genomic alterations are fixed or, in case this cannot be done, apoptosis is induced. Still, there are circumstances when control mechanisms are avoided and, consequently, the cell goes on dividing chaotically. Barrett oesophagus is a physiopathological condition in which the normal squamous oesophageal epithelium is replaced by columnar epithelium, more resistant to chemical aggression, but with a greater risk of developing oesophageal adenocarcinoma. In Barrett oesophagus a wide scale of genetic, molecular, biochemical, cytological and immunological abnormalities are recorded, but there are also cell cycle changes and these changes are more obvious and more severe by the increase of dysplasia level and by their evolution towards a malignant status. The importance of these changes lies in the fact that they appear before histological changes occur and that they can quantify the risk of evolution towards oesophageal adenocarcinoma.*

**Keywords:** Barrett oesophagus, oesophageal adenocarcinoma, cell cycle, molecular changes, genetical changes.

Articol intrat la redacție în data de: 16.02.2010

Primit sub formă revizuită în data de: 15.04.2010

Acceptat în data de: 05.05.2010

Adresa pentru corespondență: gsaraci@yahoo.com

## Introducere

Ciclul celular normal cuprinde patru faze principale (G1, G2, S, M), precum și o fază (G0), în care celulele se află în stare dormantă înainte de a intra propriu-zis în ciclul celular sub influența diferiților factori de creștere. În faza G1 are loc acumularea de ARN și de factori necesari transcrierii și traducerii, iar sinteza ADN se realizează în faza imediat următoare, faza S. Urmează faza G2, când încetează sinteza ADN, iar apoi mitoza (faza M), respectiv diviziunea celulară cu profaza, metafaza, anafaza și telofaza [1]. Reglarea ciclului celular are loc sub influența diferitelor proteine citoplasmice, dintre care rol important au ciclonele și kinazele ciclin-dependente. Ciclonele pot aparține fazei G1 (ciclina D), fazei S (ciclonele A și E) sau mitozei (ciclonele A și B). Dintre kinazele ciclin-dependente (Cdks), Cdk4 aparțin fazei G1, Cdk2 fazei S și Cdk1 fazei M [2]. Aceste kinaze au concentrații celulare aproximativ constante, fiecare kinază pentru a fi activă trebuind să se lege cu ciclina corespunzătoare, nivelele lor celulare fiind variabile în timp, iar activarea se realizează prin fosforilare, în momentul legării [1]. În esofagul Barrett, dar mai ales în evoluția acestuia către adenocarcinom esofagian, apar diferite disfuncționalități în reglarea ciclului celular, care generează în final fenotipul malign [2].

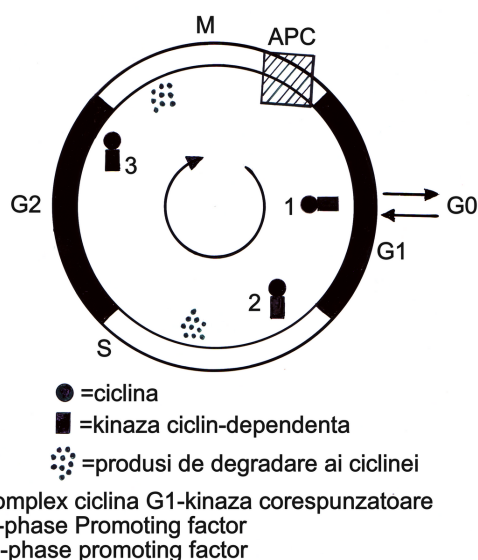


Fig. 1. Fazele și reglarea ciclului celular eucariot - schemă.

## Ciclul celular normal și patologic

Complexul APC (anaphase promoting complex) sau ciclosomul lizează proteinele de adeziune intercromatidică (coezinele), separă cromatidele cromosomiale și degradează ciclina mitotică B [3].

Creșterea concentrației de ciclone G1 care se leagă de kinazele complementare dă semnal celulei să se pregătească pentru replicarea cromosomilor, apoi crește și nivelul SPF (S-phase promoting factor), care constă în ciclina A legată de Cdk2, ce pătrunde în nucleul celulei și permite

acesteia să înceapă duplicarea ADN și a centrosomilor. Pe măsură ce replicarea are loc, ciclina E este distrusă și crește nivelul de ciclone mitogene (în faza G2) [4].

MPF (M-phase promoting factor) constă în complexul de ciclone mitogene legate de kinazele fazei M. Acesta inițiază asamblarea fusului mitotic, ruperea membranei nucleare și condensarea cromosomilor, fenomen ce are loc în metafază. Tot acum MPF activează APC, permițând separarea cromatidelor surori și orientarea lor către poli celulari în timpul anafazei, precum și distrugerea ciclonei B care se realizează prin atașarea de ubiquitină (coenzima Q10), care este ținta de distrugere a proteasomului. MPF activează totodată sinteza de G1 ciclone necesare ciclului celular următor și degradează geminina, proteina care a împiedecat ADN-ul proaspăt sintetizat în faza S să fie rereplicat înaintea mitozei [5,6].

Controlul calității ciclului celular este realizat de câteva sisteme care întrerup ciclul celular dacă ceva nu funcționează conform planului normal. Un punct de control se află la sfârșitul fazei S, prin monitorizarea fragmentelor Okazaki, apărute prin replicarea catenei a doua a matriței ADN. Atât timp cât aceste fragmente nu sunt unite de către ligaze într-o catenă ADN compactă, celula rămâne blocată în faza S [7].

Pentru sesizarea leziunilor ADN există trei puncte de control: înaintea fazei S (control G1), în timpul fazei S și, respectiv, după replicare (control G2). În fine, s-au descoperit și puncte de control ale fusului de diviziune, care decelează orice nereușită a fibrelor fusului de a se atașa de kinetocori și blochează celula în metafază (control M). Este detectată astfel și alinierea imprecisă a fusului de diviziune, caz în care se blochează citokineza, iar, în cazuri de leziuni ireparabile, se declanșează apoptoza [2].

Toate aceste puncte de control necesită anumite complexe proteice codate de către oncogene. Acestea pot suferi mutații și conduc la apariția diverselor neoplazii. Proteina p53 sesizează lezarea ADN și oprește progresiunea celulei în cadrul ciclului celular la nivelul fazei G1. Gena p53 este o genă supresoare tumorală, însă, în cazul mutației ambelor alele, p53 funcționează ca o oncogenă. Proteina p53 are de asemenea rol central în apoptoză [8]. Adenovirusul ONYX-015, creat prin inginerie genetică, se poate replica numai în celulele în care proteina p53 este nefuncțională, infectând și omorând celulele canceroase in vitro. În cazul leziunilor ADN minore, p53 blochează celulele în etapa ciclului celular în care acestea se află, până când leziunile se remediază. În cazul leziunilor ireversibile p53 induce apoptoza [9,10].

Proteina ATM (ataxia teleangiectasia mutated) decelează leziunile ADN, în special dacă acestea coexistă pe ambele catene și întrerupe ciclul celular împreună cu p53. Ea menține de asemenea în limite normale lungimea teleomerilor [11].

Genele MAD (mitotic arrest deficient) codifică două proteine care se fixează fiecare pe câte un kinetocor

până când fusul de diviziune se atașează de el. Dacă acestă atașare corectă nu se produce, proteinele MAD rămân atașate și blochează intrarea în anafază. Mutațiile genei MAD, cu deficit funcțional de proteine MAD, fac celula să termine mitoză producând celule fiice cu prea mulți sau prea puțini cromosomi, fenomen cunoscut sub numele de aneuploidie, marca genetică a neoplaziilor. Spre exemplu, genomul virusului HTLV-1 codifică o proteină Tax care se leagă de proteinele MAD umane conducând la ineficiența punctului de control de la nivelul fusului de diviziune și crează premisele apariției aneuploidiei [12,13].

Teoria actual acceptată de dezvoltare a displaziei și ulterior a cancerului este cea propusă pentru prima dată de către Peter Nowell [14]. Conform acesteia, în timpul evoluției unei celule normale către neoplazie, se petrec, sub influența factorilor de mediu și ai celor ereditari, o serie de anomalii genetice, respectiv leziuni ale genomului [15]. Celulele purtătoare de defecte genetice se pot divide normal, înlocuind celulele vecine distruse în mod fiziologic prin apoptoză, până când se dezvoltă o serie de populații celulare subclonale cu defecte genetice suplimentare. Prin sumarea acestor defecte se ajunge în final la apariția celulei tumorale [16]. Modelul de inactivare antioncogenică dezvoltat de epidemiologul Alfred Knudson postulează că pentru compromiterea funcției genelor supresoare tumorale este nevoie de inactivarea ambelor alele [17]. În cazurile ereditare, prima mutație asigură susceptibilitatea genetică, iar aceasta este transmisă linilor celulare următoare. Factorii de mediu pot induce inactivarea și a celei de a doua alele de pe cromosomul omolog, fapt ce conduce la o supresie antitumorală totală și astfel la transformarea clonală malignă. Până în prezent se cunosc peste 30 de gene supresoare tumorale (Rb, APC, k-ras, HMAD4 etc.), majoritatea asociate cu cancere familiale, dar și sporadice [18].

### **Modificări ale ciclului celular în esofagul Barrett**

La nivelul EB în tranziție spre adenocarcinom esofagian se găsesc, în principal, trei tipuri de anomalii: accederea unui număr anormal de mare de celule din faza G0 în faza G1, pierderea controlului tranziției din faza G1 în S și, respectiv, acumularea unui număr mare de celule în faza G2. Aceasta din urmă este întâlnită în special la cei cu aneuploidie și displazie severă [19]. În progresiunea EB spre adenocarcinom au rol de asemenea TNF $\alpha$  și IL1, citokine eliberate în cantități crescute ca răspuns la refluxul duodeno-gastro-esofagian, cu rol în activarea așa numitei căi NF-KB [20]. NF-KB cuprinde o familie de factori inductibili ai transcripției, cu rol cheie în reglarea imunității, a răspunsului inflamator, a proliferării celulare și a apoptozei. Astfel, TNF $\alpha$  și IL1, eliberați ca urmare a RGE, induc un status anti-apoptotic prin activarea căii NF-KB, fapt ce crește proliferarea celulelor stem la nivelul esofagului. Acest amănunt are o mare importanță practică și conferă un statut aparte supresiei acide în managementul

EB [21].

În momentul trecerii de la EB la adenocarcinom se înregistrează o creștere a proliferării celulare, ceea ce arată că, în cadrul ciclului celular, sunt depășite mecanismele de control ale tranziției între faze, respectiv punctele de control (check point) dintre faze, controlate de către diverse ciclone cu funcții protein-kinazice. În consecință, la nivelul esofagului Barrett, se înregistrează, pe măsura malignizării, supraexpresia ciclonei D1 și a ciclonei E, scăderea expresiei și pierderea heterozigotiei (LOH) la nivelul genei Rb, precum și acumularea importantă de proteine P53 mutante, cu pierderea controlului tranziției G1-S [22]. Apare de asemenea inactivarea prin hiperfosforilare sau deleție a genei p16 ce codează o ciclină inhibitoare a complexului ciclină D1/CDK [23].

Gena p27 e inactivată în adenocarcinomul esofagian, iar lipsa produsului genic al acesteia este asociată cu o agresivitate mai mare a adenocarcinomului [22].

Acumularea celulară în faza G2 apare precoce în progresiunea EB și se datorează implicării ciclonei B1 care intervine în faza G2, prin reglarea intrării în mitoză. FGF1 și FGF2 se găsesc în cantități mari la nivelul EB cu evoluție spre adenocarcinom, la fel și VEGF (vascular endothelium growth factor), cu rol în angieneză. Expresia crescută a acestuia din urmă este corelată cu prezența precoce a metastazelor ganglionare și la distanță, precum și cu un prognostic sumbru [24].

Integritatea membranei bazale este menținută printre altele și de către complexul calciu-dependent de aderență a caderinei și cateninei de membrană, care asigură integritatea epitelială, polarizarea celulei și adeziunea intercelulară. Pierderea comunicării intercelulare și supresia exprimării caderinei E pot facilita apariția metastazelor precoce. TNF $\alpha$  induce expresia oncogenei c-myc prin intermediul  $\beta$ -cateninei, însă rolul complexului nuclear E caderină –  $\beta$ -catenină nu este încă complet elucidat [23]. Produsul genei APC (adenomatous polyposis coli) se leagă de catenină și unește caderinele transmembranale cu filamentele de actină ale citoscheletului. Alterarea locusului APC prin hipermetilare este întâlnită în majoritatea adenocarcinoamelor esofagiene dezvoltate de EB și este indicator al unei evoluții nefavorabile [25].

### **Consecințe practice ale aspectelor moleculare în esofagul Barrett**

În lumina modificărilor celulare și moleculare ce apar în EB și în timpul evoluției acestuia către adenocarcinom esofagian, este evident că simpla descriere morfologică și histologică a acestor afecțiuni nu mai este satisfăcătoare. Aceasta cu atât mai mult cu cât modificările de la nivel subcelular preced modificările morfologice și pot preconiza modalitatea de evoluție [26]. În acest sens, prin tehnicile de imunofluorescență și hibridizare in situ, pot fi demonstrate pierderile de material genetic la nivelele 4q, 5q, 9p, 18q, 7q și 14q, precum și câștig de material

genetic în zonele 8q, 2p, 7p, 10q, 15q și 17p. Aceste tehnici capătă o importanță cu atât mai mare cu cât delețiile de la nivelul 4q apar atât în adenocarcinomul esofagian, cât și în EB cu displazie severă și indică o probabilitate mare de evoluție spre adenocarcinom [26,27,28].

Utilizând tehnicile de tip microarray se poate cuantifica gradul de expresie sau supresie a anumitor gene. Astfel, s-a demonstrat supraexpresia genei *erbB2* în celulele metaplazice cu displazie de grad înalt și în adenocarcinoamele esofagiene. Produsul acestei gene este o proteină transmembranară cu activitate proteinkinazică asociată cu agresivitate tumorală crescută, metastaze ganglionare precoce și prognostic sumbru [29]. Displazia de grad înalt și adenocarcinomul sunt acompaniate de supraexpresia genei *c-myc*, supresia genei *Cdkn1B* și *MGMT*, precum și de pierderea heterozigotiei la nivelul benzii 5q21 (LOH 5q21) [30]. Pierderea heterozigotiei la nivelul 17p13 însoțește metaplazia intestinală, cu sau fără displazie, dar și adenocarcinomul esofagian și crește de 16 ori riscul progresiunii maligne [30]. *Cdx1* și *cdx2* sunt supraexprimate în întreaga secvență metaplazie-adenocarcinom, în timp ce supresia *GPX3* însoțește statutul displazic și malign [31]. Pentru displazia de grad scăzut este sugestivă supresia *GPX7*, iar pentru cea de grad înalt și adenocarcinom, supresia *MGMT* [32]. O serie întreagă de citokine (*TNFα*, *IL1*, *IL2*, *TGFβ*) au concentrații crescute în serul pacienților cu metaplazie intestinală și indică o evoluție mai probabilă către starea displazică și neoplazică [26].

## Bibliografie

- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246(4930):629-634
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266(5192):1821-1828
- Tselepis C, Perry I, Jankowski J. Barrett's Esophagus: Disregulation of Cell Cycling and Intercellular Adhesion in the Metaplasia-Dysplasia-carcinoma sequence. *Digestion* 2000;61:1-5
- Reid BJ, Levine DS, Longton G et al. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *American Journal of Gastroenterology* 2000;95(7):1669-1676
- Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC et al. Predictors of progression in Barrett's esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *The American Journal of Gastroenterology* 2001;96(10):2839-2848
- Reid BJ. P53 and neoplastic progression in Barrett's esophagus. *The American Journal of Gastroenterology* 2001;96(5):1321-1323
- Teodori L, Gohde W, Persiani M et al. DNA/protein flow cytometry as a predictive marker of malignancy in dysplasia-free Barrett's esophagus: thirteen-year follow-up study on a cohort of patients. *Cytometry* 1998;34(6):257-263
- Maley C. Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2007 Jan 8;245(1-2):22-32
- Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ et al. Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1316-1321
- Koppert LB, Wijnhoven BP, van Dekken H. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005 Dec 1;92(3):169-190
- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426
- El-Rifai W, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. *Gastroenterology* 2001 Sep;121(3):592-598
- Peng DF, Razvi M, Chen H. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 2009 Jan;58(1):5-15
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2000;344:783-792
- Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohtula T et al. Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:2971-2979
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-823
- Tselepis C, Morris CD, Wakelin D et al. Upregulation of the oncogene C-myc in Barrett's adenocarcinoma: Induction of C-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003;52:174-180
- Fitzgerald RC. Molecular basis of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2006 Dec;55(12):1810-1820
- Oberg S, Wenner J, Johansson J. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005 Jul;242(1):49-54
- Fitzgerald RC. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: how does acid interfere with cell proliferation and differentiation?. *BMJ Publishing Group Ltd & British Society of Gastroenterology* 2005;54:21-26
- Sarbia M, Bektas N, Mullet W et al. Expression of cyclin e dysplasia, carcinoma and nonmalignant lesions of Barrett's oesophagus. *Cancer* 1999;86:2597-2601
- Bian YS, Osterheld MC, Fontollet C. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):1113-1121
- Awakami K, Bradbender J, Lord RV et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with oesophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;2:1805-1811
- Lee OJ, Schneider-Stock R, McChesney PA. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia* 2005 Sep;7(9):854-861
- Lagarde SM, ten Kate FJ, Richel DJ. Molecular Prognostic Factors in Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastroesophageal Junction. *Ann of Surgical Oncology* 2006;14(2):977-991
- Razvi MH, Peng D, Dar AA. Transcriptional oncogenomic hot spots in Barrett's adenocarcinomas: serial analysis of gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007 Oct;46(10):914-928
- Morales CP, Lee EL, Shay JW. In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's

esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 1998;83:652-659

29. Geddert E, Zeriouh M, Wolter M. Gene Amplification and Protein Overexpression of c-erb-b2 in Barrett Carcinoma and Its Precursor Lesions. *Am J Clin Pathol* 2002;118:60-66

30. Ortega J, Hernandez S, Saez MC. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13.1 allelic deletions are potential markers of individuals with a high risk of developing adenocarcinoma in Barrett's epithelium

without dysplasia. *Hepatogastroenterology* 2003;50(50):404-407  
31. Kazumori H, Isihara S, Kinoshita Y. Roles of caudal-related homeobox gene Cdx1 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development. *Gut* 2009;58:620-628

32. Kuester D, El-Rifai W, Peng D. Silencing of MGMT expression by promoter hypermethylation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2009 Mar 8;275(1):117-126