

DOTTORATO DI RICERCA IN
MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA
XVII CICLO

Coordinatore: Chiar.ma prof.ssa Stefania Montagnani

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

TESI FINALE AL TERMINE DEL III ANNO DI CORSO

TITOLO: “ Studio dell’espressione dell’*Homeobox gene* CDX2 nella metaplasia intestinale e nelle lesioni neoplastiche e preneoplastiche dello stomaco e correlazioni clinico-patologiche con l’infezione da *Helicobacter Pilory*”.

RELATORE: Chiar.ma prof.ssa Stefania Staibano

CANDIDATO: dott. Pasquale Somma

INTRODUZIONE

L'adenocarcinoma gastrico rimane una delle maggiori cause di morbilità e mortalità per malattie neoplastiche nei paesi occidentali nonostante una significativa riduzione di incidenza negli anni recenti.

L'infezione da *Helicobacter Pilory* (HP), batterio spiraliforme, gram-negativo non sporigeno, capace di resistere al microambiente acido della mucosa gastrica e dotato di diversi fattori di virulenza (tossine, lipopolissaccaridi ed altre molecole di membrana), considerato un carcinogeno di I livello dalla World Health Organization (WHO), determina, inizialmente, una gastrite non-atrofia e molti soggetti continuano a presentare una gastrite non-atrofica HP associata, per lunghi periodi di tempo.

Una minoranza di questi, con severa infiammazione della mucosa antrale, sviluppa una ulcera duodenale, ed in pochi casi, per ragioni sconosciute, può sviluppare un linfoma gastrico tipo MALT.

In alcuni casi l'infezione da HP può essere seguita da una progressiva e multifocale atrofia della mucosa gastrica (gastrite cronica atrofica) con perdita della componente ghiandolare che a sua volta può essere seguita dalla metaplasia intestinale (MI) che rappresenta, invece, la alterazione della normale morfogenesi gastrica coinvolta nel processo *multisteps* di cancerogenesi (1,2).

La metaplasia intestinale (IM) è caratterizzata dalla sostituzione delle cellule epiteliali gastriche di tipo ghiandolare e di superficie con cellule simili a quelle della mucosa intestinale.

La sua frequenza aumenta con l'età ed interessa soprattutto la regione antrale e pilorica, mentre si presenta in forma molto grave a livello del fondo nei portatori di anemia perniciososa.

Le caratteristiche istologiche principali consistono nella presenza di abbondanti cellule mucino-secerenti e cellule di Paneth. La struttura delle cripte è conservata e le cellule colonnari mostrano microvilli sul margine libero, espressione tipica dell'epitelio intestinale.

La metaplasia intestinale viene oggi suddivisa in due sottotipi: completa (o di tipo I) se sono presenti tutti gli enzimi contenuti normalmente nella mucosa intestinale, incompleta (di tipo II), se è presente soltanto una limitata quantità dei medesimi enzimi.

Nella *metaplasia intestinale di tipo I* le cellule metaplastiche hanno forte rassomiglianza con quelle della mucosa del tenue, con villi più corti e arrotondati e con la permanenza in alcune zone delle ghiandole gastriche; sono di frequente riconoscibili le cellule di Paneth. La sequenza di cellule cilindriche non

mucosecernenti è interrotta dalla presenza di cellule caliciformi, secernenti sialomucine del tipo N-acetilato o O-acetilato, raramente solfomucine.

La metaplasia intestinale di tipo II (incompleta) è caratterizzata dalla presenza di cellule caliciformi e cellule colonnari, e presenta a sua volta due varianti:

- il tipo IIA, nel quale le cellule caliciformi secernono esclusivamente N-acetil-sialomucine e mucine neutre. Le solfomucine sono quasi completamente assenti;
- il tipo IIB (o metaplasia colica) nel quale le cellule colonnari secernono grandi quantità di solfomucine.

In questo ultimo tipo di metaplasia si riscontrano frequenti irregolarità architetturali della mucosa (cripte allungate, tortuose, ramificate, formazioni papillari e atipie cellulari): l'associazione con il carcinoma gastrico di tipo intestinale è frequente e significativa.

Le atipie citologiche e le distorsioni dell'architettura della mucosa presenti in questo tipo di metaplasia soddisfano pienamente i criteri della displasia lieve, confermando la sequenza ***gastrite cronica → metaplasia intestinale → displasia → adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale*** (3).

La MI può essere pertanto considerata uno dei diversi *steps* di alterazioni a carico della mucosa gastrica che, in ultima analisi, portano alla trasformazione neoplastica della stessa ed è strettamente correlata all'infezione da HP.

I meccanismi molecolari alla base dello sviluppo della MI gastrica non sono ancora stati completamente chiariti, tuttavia, studi recenti dimostrano che il fenotipo intestinale della mucosa gastrica è legato alla riattivazione del gene CDX2 che appartiene alla famiglia degli *Homeobox genes*.

Questi ultimi, omologhi dei *caudal genes* descritti per la prima volta nella *Drosophila Melanogaster*, svolgono un ruolo essenziale durante lo sviluppo morfogenetico dell'intestino primitivo, ma nei mammiferi adulti il loro ruolo fisiologico è confinato all'intestino (4).

Un aspetto molto importante è rappresentato dalla possibile reversibilità della metaplasia intestinale gastrica dopo l'eradicazione dell'HP, soprattutto in considerazione del possibile ruolo di lesione preneoplastica svolto da quest'ultima. Diversi studi hanno mostrato solo una parziale riduzione della metaplasia intestinale dopo l'eradicazione dell'HP (5,6), mentre l'eradicazione dell'HP determinerebbe un rallentamento della progressione della MI in adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale (7).

Scopo del nostro studio è quello di studiare, mediante immunocistochimica, prima e dopo l'eradicazione farmacologica dell'infezione da HP, l'espressione di CDX2 nelle ghiandole gastriche con metaplasia intestinale in 30 casi di gastriti croniche atrofiche con metaplasia intestinale e nelle lesioni preneoplastiche (displasia) e neoplastiche (adenocarcinoma) in 10 casi di adenocarcinoma

moderatamente differenziato che presentavano metaplasia intestinale, iperplasia e displasia ghiandolare di grado moderato-severo nelle aree limitrofe alla neoplasia.

MATERIALI E METODI

30 casi di gastriti croniche atrofiche (GCA) con associata metaplasia intestinale matura (completa) e 10 casi di adenocarcinoma gastrico moderatamente differenziato sono stati selezionati tra quelli esaminati presso la sezione di Anatomia Patologica e Citopatologia del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università "Federico II" di Napoli e l'Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica dell'Ospedale "D.Cotugno" Napoli, dal gennaio 1995 a febbraio 2002.

L'età dei pazienti era compresa tra i 28 ed i 60 anni (media 45,3) per i pazienti affetti da gastrite cronica atrofica con metaplasia intestinale e tra i 45 ed i 65 anni (media 55,2) per i pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico.

Per ogni caso è stato considerato un follow-up di almeno tre anni.

Di ogni caso erano disponibili almeno due biopsie effettuate prima e dopo il trattamento farmacologico per l'eradicazione farmacologica dell'HP.

Nei dieci casi di adenocarcinoma, sulla stessa sezione colorata con ematossilina/eosina, era possibile osservare la progressione morfologica: metaplasia intestinale > displasia > adenocarcinoma.

Tutti i casi di adenocarcinoma gastrico erano moderatamente differenziati (G2) con stadio patologico pT2bN1Mx.

I pazienti reclutati per lo studio avevano sospeso la terapia farmacologica per la gastrite cronica e per l'eradicazione dell'HP almeno un mese prima di essere sottoposti alla biopsia endoscopica.

Di ogni caso di gastrite cronica atrofica con metaplasia intestinale erano disponibili blocchetti paraffinati relativi alle biopsie dell'antro e del corpo dai quali sono state ottenute sezioni colorate con ematossilina/eosina per confermare la diagnosi precedente, e 5 sezioni da 4 montate su vetrini pretrattati con poli-L-lisina, per lo studio immunohistochimico.

Dei casi di neoplasia sono state selezionate le sezioni più rappresentative e dopo la conferma della diagnosi e della stadiazione precedente, dai relativi blocchetti in

paraffina sono state ottenute 5 sezioni da 4 e montate su vetrini pretrattati con poli-L-lisina per lo studio immunohistochimico.

Tessuto normale di 11 pazienti sottoposti a biopsia endoscopica gastrica è stato utilizzato come controllo.

Lo studio è stato condotto secondo le norme del Comitato Etico locale, previo consenso informato da parte dei pazienti.

Le diagnosi istopatologiche sono state formulate secondo le linee guida del Sistema Sydney (8) per quanto riguarda le gastriti e della World Health Organization (WHO) per i casi di adenocarcinoma gastrico (9).

Immunohistochimica

Le sezioni paraffinate hanno subito un trattamento termico con cicli di tre minuti ciascuno in tampone citrato 10^{-3} M a pH 6, allo scopo di ottenere lo smascheramento antigenico. Al fine di evitare legami non specifici dell'anticorpo primario, le sezioni sono state preincubate con siero non immune di topo (1:20, Dakopatts, Hamburg, Germany) diluito in PBS/BSA (1%) per 25 minuti a temperatura ambiente. Dopo il blocco delle perossidasi endogene con perossido di idrogeno allo 0.3% in metanolo, seguito da due lavaggi con tampone Tris-HCL, le sezioni sono state incubate con

l'anticorpo primario anti-CDX2 (CDX2, clone AMT28, mouse monoclonal, Novocastra Laboratories Ltd, diluizione, diluizione 1:50).

E' stata usata la tecnica standard della streptavidina-biotina- perossidasi con incubazioni sequenziali di 20 minuti con anticorpo biotilinato usato come link e la streptavidina coniugata con perossidasi (DAKO LSAB kit HRP, Carpenteria, CA). La 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) è stata usata come substrato cromogeno. Dopo il contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state montate mediante mezzo di montaggio sintetico (Eukitt, Kindler GmbH & Co, Freiburg). Come controllo positivo è stata valutata la immunoreattività' del tessuto cutaneo sano peritumorale. I controlli negativi sono stati effettuati usando, contemporaneamente all'anticorpo primario, un anticorpo con specificita' irrilevante ma con lo stesso isotipo dell'anticorpo primario.

L'espressione di CDX2 è stata valutata semiquantitativamente secondo i seguenti parametri arbitrari: 0 (< 5% di cellule positive); + (\leq 25% delle cellule positive); ++ (26-50% delle cellule positive); +++ (>50% di cellule positive).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati usando il metodo dell'analisi della varianza ed il test di Student-Newman-Keuls (PRISM 3.0 per Windows e Stanton A. Glantz 3.0 per DOS). Solo i valori di $p < 0.05$ sono stati ritenuti significativi.

RISULTATI

I casi da noi studiati hanno mostrato una positività nucleare per CDX2 nelle cellule con fenotipo metaplastico presenti nelle ghiandole gastriche ; il segnale è risultato leggermente piu' intenso nei casi di metaplasia intestinale completa (Foto 1).

Espressione nucleare di CDX2 è stata osservata anche nelle aree di mucosa gastrica nelle quali il fenotipo intestinale non era ancora evidente, ma vicine alle zone di metaplasia intestinale.

Dopo l'eradicazione farmacologia dell'HP, il fenotipo metaplastico non era piu' osservabile in 5 casi ed in 4 casi la metaplasia intestinale è risultata solo focale (Foto 2) rispetto al campione prelevato prima della terapia farmacologia per l'eradicazione dell'HP (Foto 3).

L'espressione di CDX2 non ha subito apprezzabili variazioni percentuali; anche l'intensità di espressione è risultata sovrapponibile a quella osservata prima del trattamento farmacologico (Foto 4).

Nel nostro studio l'espressione di CDX2 ha subito una graduale riduzione sia di intensità di segnale che in termini di percentuale di cellule positive nel passaggio dalle aree di metaplasia a quelle di neoplasia (Foto 5, 6). Le aree francamente neoplastiche sono risultate tutte negative per CDX2 tranne in un caso dove si è osservato una delocalizzazione citoplasmatica del segnale (Foto 7).

DISCUSSIONE

CDX2 (caudal type homeobox 2) appartiene al gruppo degli *homeobox (hox) genes* con caratteristiche strutturali e funzionali simili ai caudal homeobox genes espressi dalla *Drosophila melanogaster* (10,11). Tutti gli homeobox genes codificano i cosiddetti *homeodomains*, sequenze aminoacidiche tipiche (di circa 60 aminoacidi), che legano il DNA in siti specifici e controllano la trascrizione di diversi geni coinvolti nel processo dell'apoptosi e della proliferazione cellulare.

La sua espressione inizia dopo l'VIII-IX giorno di vita embrionale nei tre foglietti primitivi; in seguito è espresso soltanto dall'endoderma da cui prende origine l'intestino primitivo. Dopo la nascita, in condizioni fisiologiche, la sua espressione è limitata alla porzione caudale del tratto gastroenterico; la sua massima espressione è stata segnalata nella regione pericecale del grosso intestino e diminuisce gradualmente nelle parti distali di quest'ultimo (10).

L'importanza del ruolo svolto da questo gene durante la morfogenesi del tratto gastrointestinale è dimostrato da diverse evidenze sperimentali.

Infatti, topi CDX2^{+/-} presentano alla nascita lesioni eteroplastiche *Gastic-like* nella regione pericecale .

Tali lesioni non evolvono spontaneamente in lesioni neoplastiche, ma, come dimostrato dal gruppo di Bonhomme C e coll., in questi animali aumenta la

suscettibilità a sviluppare una adenocarcinoma della porzione distale del colon dopo trattamento con farmaci con proprietà cancerogene (azoxymethane).

In questo studio le lesioni indotte dal trattamento farmacologico nei topi CDX2^{+/-} erano molto simili, sia dal punto di vista molecolare che dal punto di vista morfologico, a quelle sviluppate dagli animali *wild-type* trattati con lo stesso farmaco e ricapitolavano la sequenza displasia>adenocarcinoma, interessando generalmente la porzione distale del colon come si osserva nella specie umana (10).

Tali evidenze sperimentali suggeriscono che la ridotta espressione del CDX2 aumenta la suscettibilità alla trasformazione neoplastica e ne facilita la progressione anche se il suo ruolo negli *steps* iniziali del processo di cancerogenesi non è chiaro.

Nella metaplasia intestinale, che segue la gastrite cronica atrofica, le cellule della mucosa gastrica deviano dal normale *pathway* di differenziazione gastrica verso un fenotipo di tipo intestinale.

Poiché, come detto in precedenza, l'infezione da HP può essere considerata una delle cause principali dell'inizio dell'alterazione del processo di morfogenesi della mucosa gastrica che dalla GCA giunge sino alla metaplasia intestinale (1,2), si è molto discusso sulla possibile regressione parziale o totale di quest'ultima lesione dopo l'eradicazione farmacologica dell'HP, soprattutto in considerazione della possibile trasformazione neoplastica di tale lesione (12,13,14).

I nostri risultati, in accordo con i dati riportati in letteratura sino a questo momento, dimostrano che la metaplasia intestinale puo' essere una lesione totalmente reversibile o soltanto parzialmente in un numero limitato di casi.

Infatti, dopo l'eradicazione farmacologica dell'HP, abbiamo osservato una scomparsa totale del fenotipo metaplastico in 5 casi ed una notevole riduzione di quest'ultimo in 4 dei 30 casi da noi studiati.

L'intensità di espressione di CDX2 non ha subito invece variazioni degne di rilievo sia come intensità di segnale che come percentuale di cellule positive nei casi che esprimevano ancora il fenotipo metaplastico dopo l'eradicazione farmacologia dell'HP.

Diversi studi epidemiologici hanno messo in evidenza una associazione tra la metaplasia intestinale e lo sviluppo del carcinoma gastrico. A tutt'oggi, non vi sono prove dirette che dimostrano che la metaplasia intestinale è una lesione preneoplastica, tuttavia, come dimostrato in un recente studio, lesioni polipoidi gastriche insorte, dopo un certo periodo di tempo, nelle aree di metaplasia intestinale di topi transgenici per CDX2, all'esame istologico sono risultate essere adenocarcinomi di tipo intestinale con invasione della sottomucosa, della *muscularis propria* e talvolta della sierosa.

Tali lesioni presentavano mutazioni dei geni p53 e APC.

Questo studio dimostra che la metaplasia intestinale può essere una lesione che precede un adenocarcinoma gastrico invasivo (15).

In un recente studio, l'espressione di CDX1 e CDX2 nella mucosa gastrica normale e con gastrite cronica da HP è stata valutata con la metodica della "reverse transcriptase-polymerase chain reaction" (RT-PCR).

L'espressione di CDX1 e CDX2 è risultata assente nella mucosa gastrica priva di infezione da HP, mentre il CDX1 e CDX2 mRNA sono risultati significativamente più elevati nella mucosa con infezione da HP.

E' da rilevare che il CDX2 è risultato espresso nella mucosa dell'antro e del fondo anche in assenza di espressione di CDX1 e di geni markers per la metaplasia intestinale (human defensin-5, alkaline phosphatase e MUC2).

Questi risultati suggeriscono che l'espressione di CDX2 svolge un ruolo importante nelle primissime fasi di sviluppo della metaplasia intestinale (16).

Altri studi hanno dimostrato che CDX2 è espresso non soltanto nella metaplasia intestinale gastrica ma anche in circa il 50-60% dei casi di adenocarcinomi gastrici di tipo intestinale studiati da vari gruppi (17,18). In questi studi è stato riportato che la ridotta o assente espressione di CDX2 era associata, in modo statisticamente significativo, ad un comportamento biologico più aggressivo da parte della neoplasia.

I nostri risultati sono in accordo con quanto riportato sino a questo momento in letteratura, infatti tutti i casi da noi studiati presentavano metastasi linfonodali dopo

la terapia chirurgica e la sopravvivenza media dei pazienti è stata di 1,5 anni.

L'espressione di CDX2 è risultata completamente assente nelle aree di displasia ghiandolare di alto grado e di neoplasia nei casi da noi studiati, tranne in un caso in cui si è osservata una debole espressione citoplasmatica sia nelle aree displastiche che in quelle neoplastiche.

In conclusione, i nostri dati confermano che CDX2 rappresenta un fattore di trascrizione coinvolto in diversi aspetti e diversi momenti della patogenesi di lesioni gastriche sia di tipo infiammatorio (gastrite cronica atrofica) che di tipo preneoplastico (metaplasia intestinale, displasia ghiandolare) e neoplastico (adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale) e che potrebbe rappresentare, se questi risultati saranno confermati da studi effettuati che hanno a disposizione casistiche più ampie, un nuovo marker prognostico per le lesioni gastriche sia di tipo preneoplastico che di tipo neoplastico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Faraji EI et al. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002 Jun;31(2):499-516.
- 2) Correa P *Am J Surg Pathol* 1995;19(Suppl I):S37-S43
- 3) H M T El-Zimaity et al *J Clin Pathol* 2001; 54:679-683.
- 4) Bonhomme C et al *Gut* 2001;52:1465-1471.
- 5) Leung WK et al *Dig Dis.* 2004;22(4):306-12.
- 6) Satoh K et al *Helicobacter.* 2002 Jun;7(3):192-8.
- 7) Leung WK et al *Gut* 2004;**53**:1244-1249
- 8) Dixon MF et al *Am J Surg Pathol.* 1996 Oct;20(10):1161-81.
- 9) World Health Classification. *Classification of Tumour of the Digestive System.* Hamilton S, Aaltouen R, (eds). Lyon, IARC Press, 2000, p.38.
- 10) Bonhomme C et al *Gut* 2003;52:1465-1471.

- 11) Beck F et al PNAS 1999; 96 (13): 7318-7323.
- 12) Satoh K et al Helicobacter 2002 ;7(3) :192-8
- 13) Ohkusa T et al Ann Intern Med 2001;134(5):380-6
- 14) Faraji EI et al Clin North Am 2002;31(2):499-516
- 15) Mutoh H et al Cancer Res. 2004;64(21):7740-7.
- 16) Eda A et al J Gastroenterol 2002 ;37(2)94-100.
- 17) Bai YQ et al Cancer Lett 2002 ;176(1) :47-55-
- 18) Seno H et al Int J Oncol 2002 ;21(4) :769-74.

LEGENDA FOTO

- 1) Intensa espressione nucleare di CDX2 nelle ghiandole con fenotipo metaplatico (IHC x400).
- 2) Metaplasma intestinale completa (E&E x 200).
- 3) Focale metaplasia intestinale (E&E x 200).
- 4) Intensa positività nucleare di CDX2 (IHC x 400).
- 5) Espressione di CDX2 nelle aree metaplastiche con graduale ridotta espressione in quelle displastiche (E&E x 40).
- 6) Assenza di espressione di CDX2 nelle aree neoplastiche (IHC x40).
- 7) Focale espressione citoplasmatiche di CDX2 nelle aree neoplastiche (IHC x630).

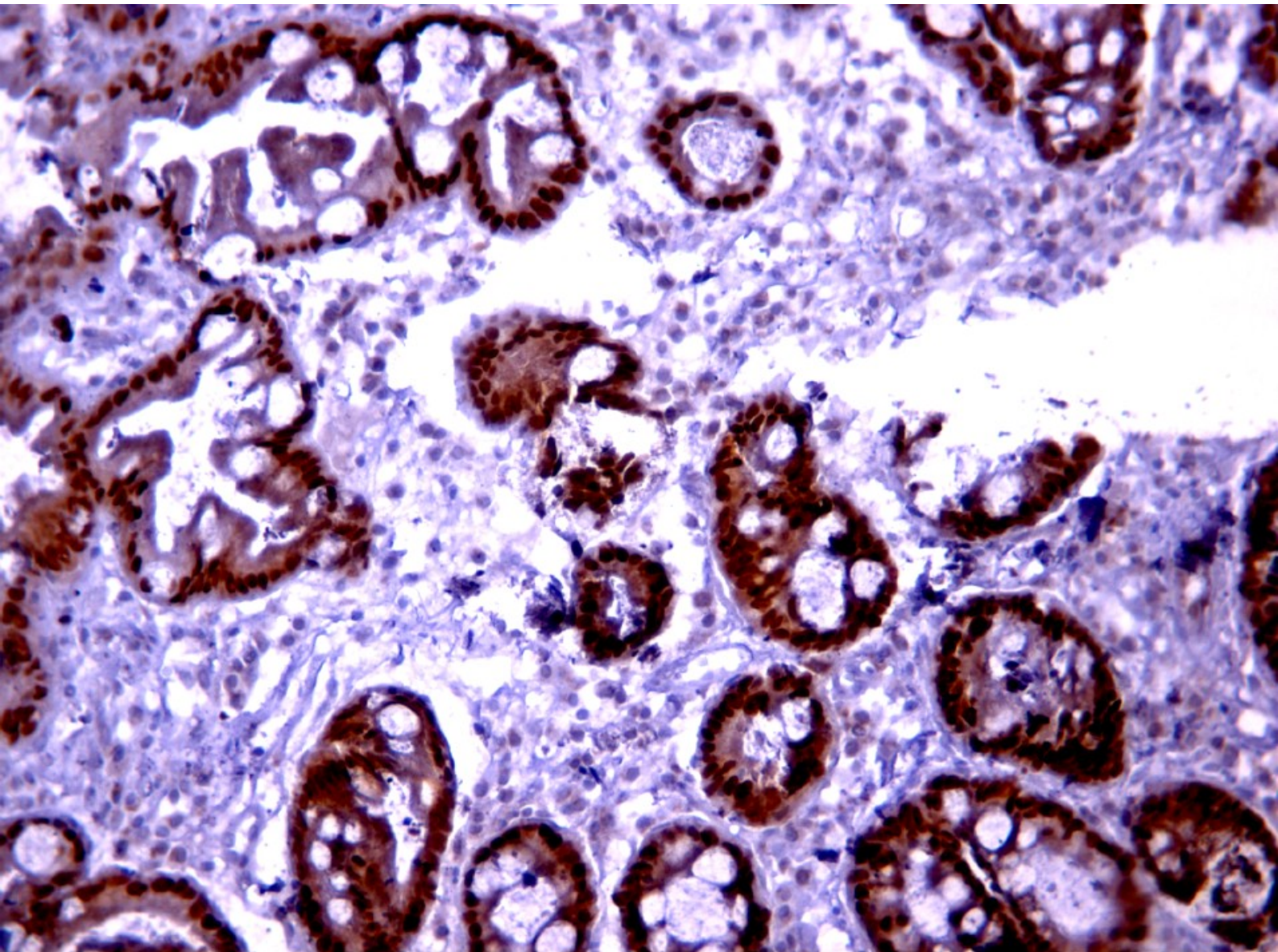


FOTO 1



FOTO 2

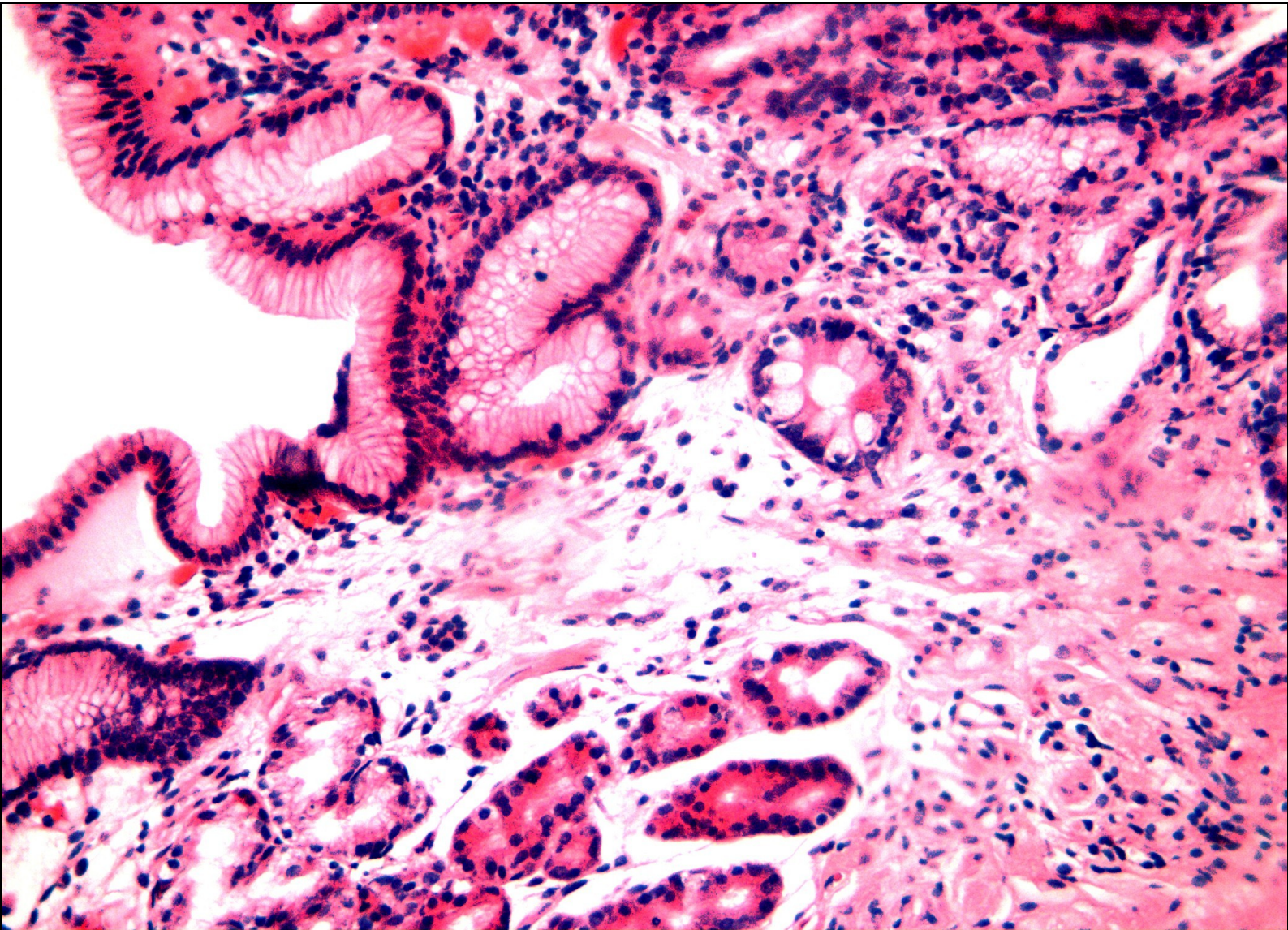


FOTO 3

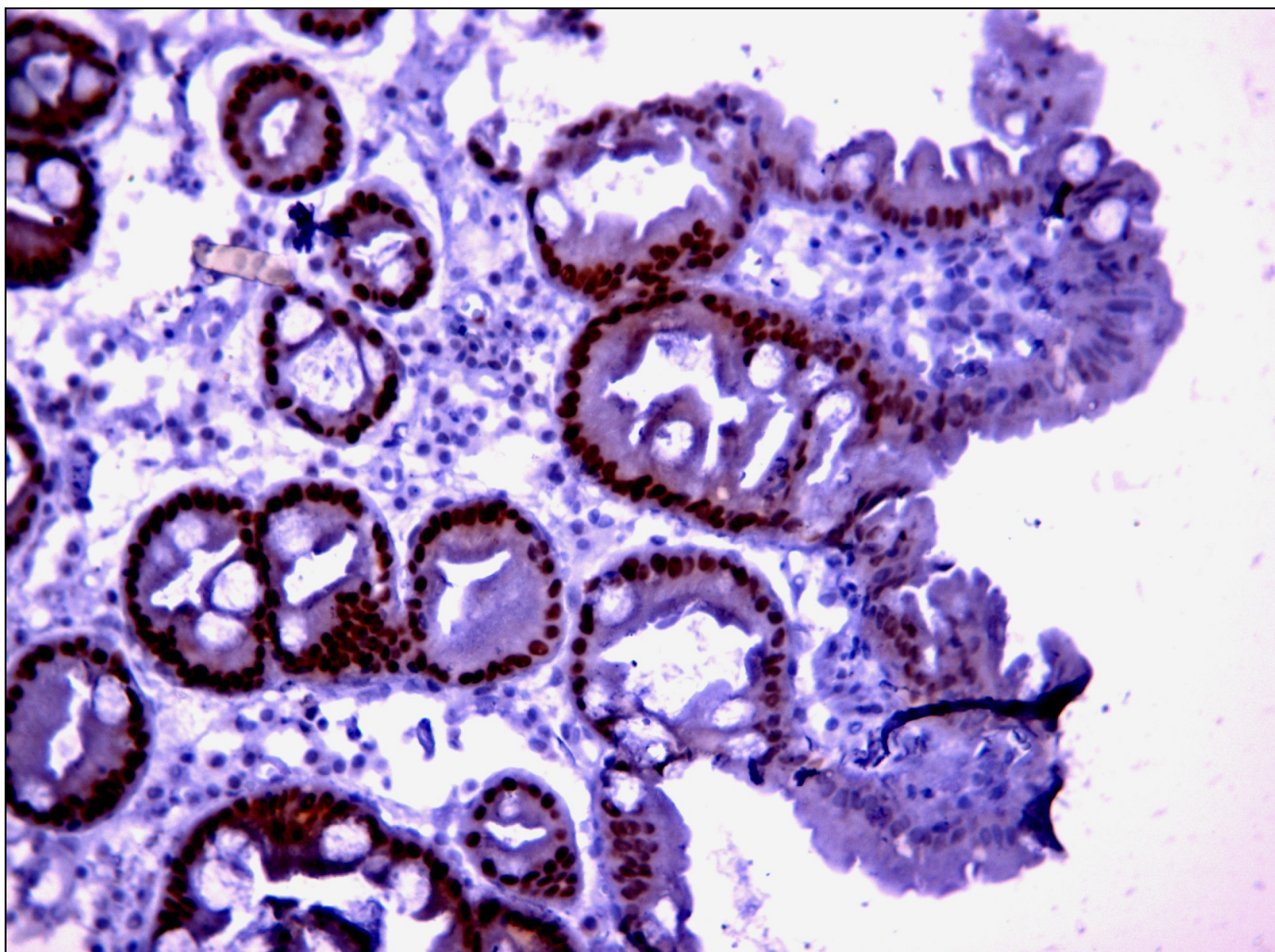


FOTO 4

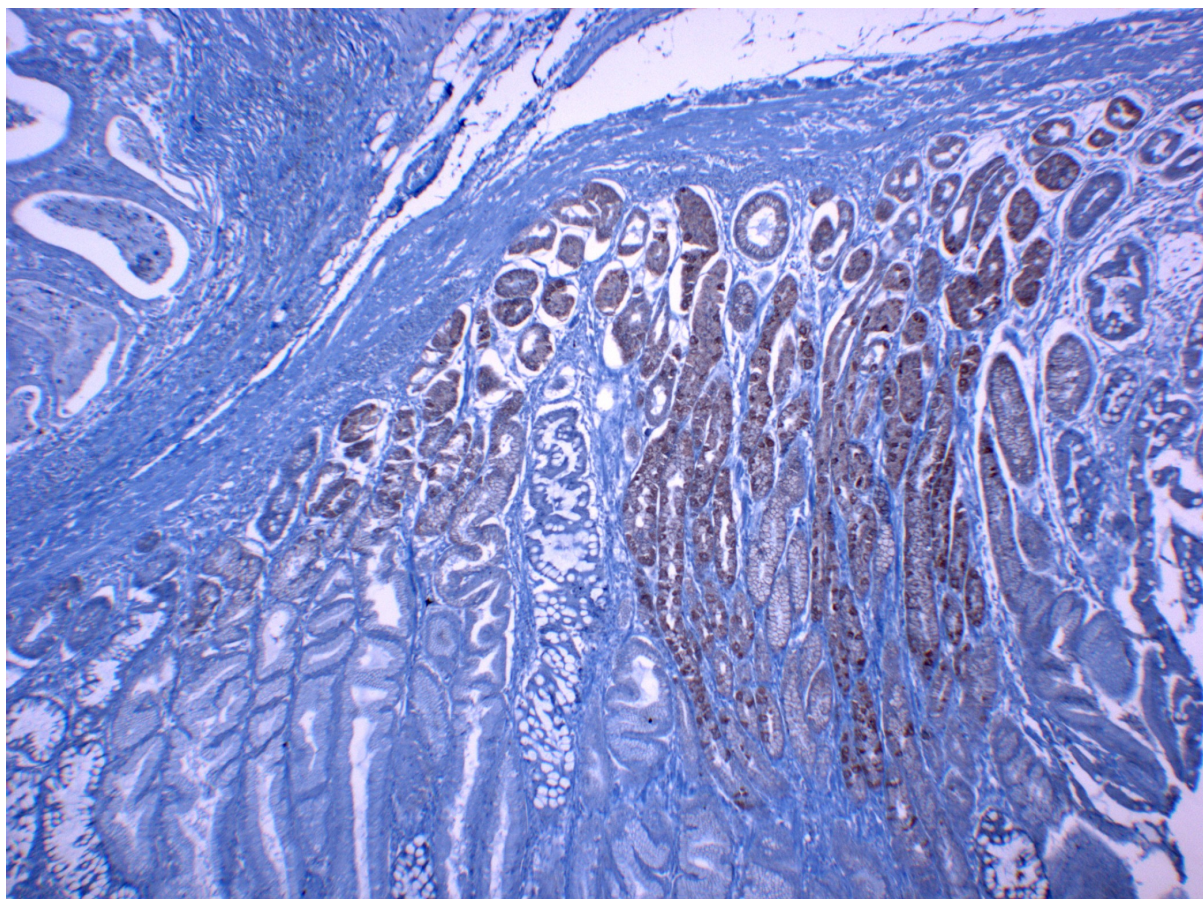


FOTO 5

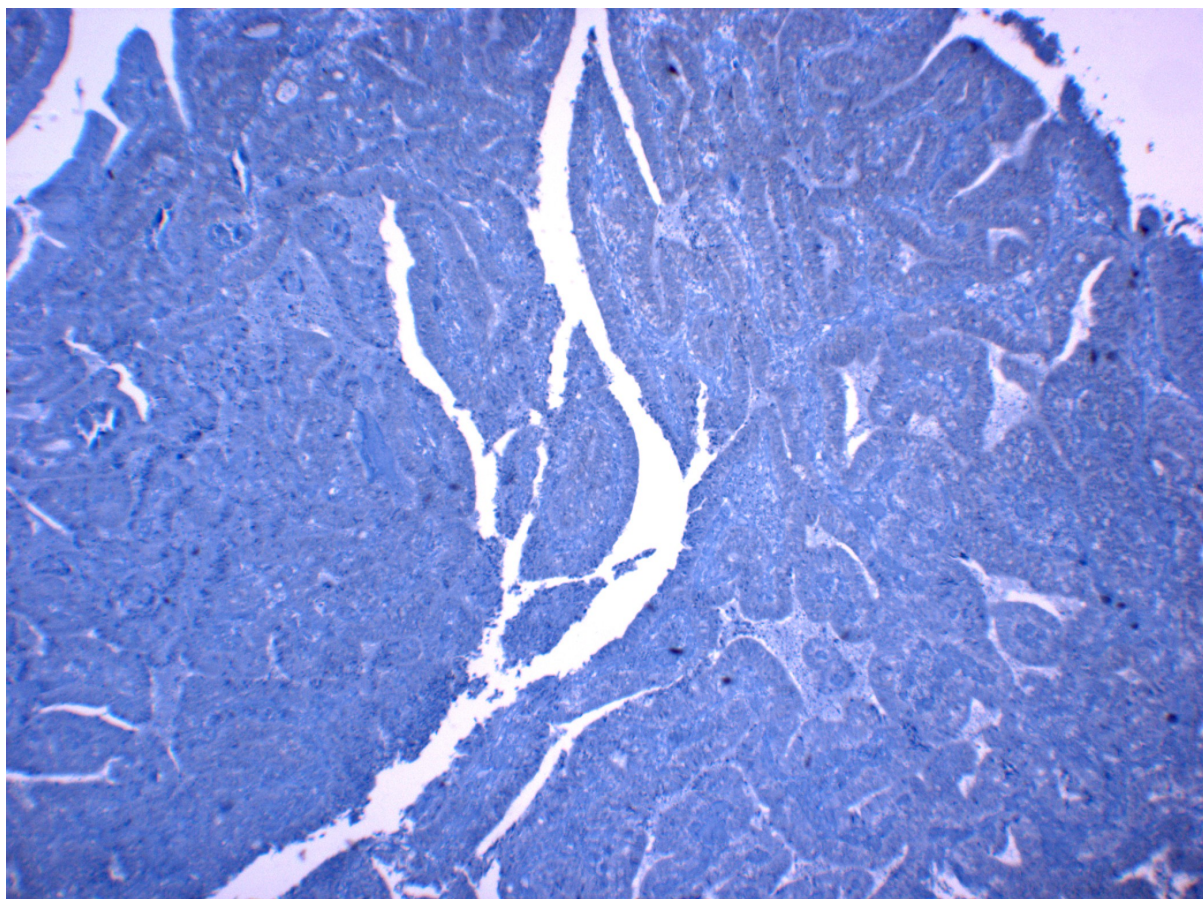


FOTO 6

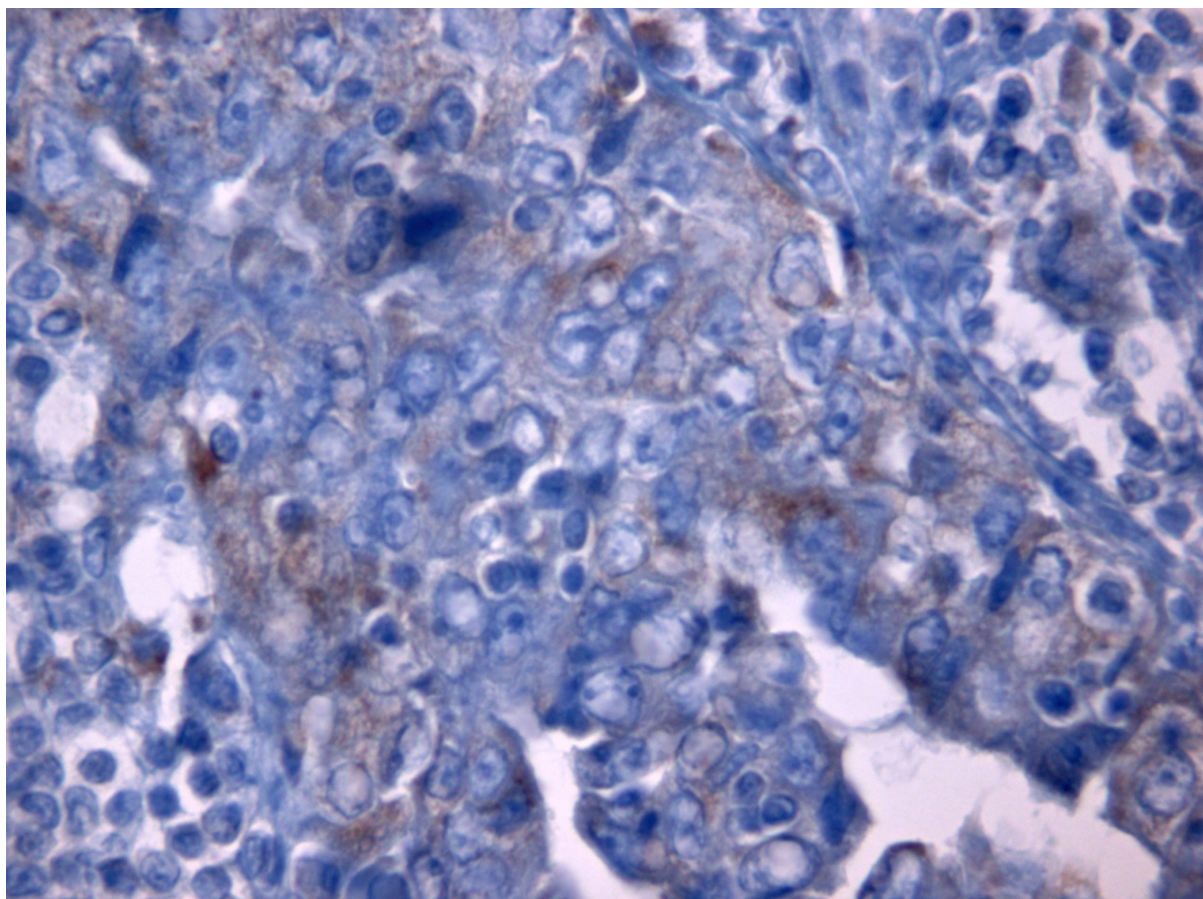


FOTO 7