



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA  
CLINICA E PATOLOGICA  
- XXI° CICLO-**

*Valutazione immunoistochimica dell'espressione di beta  
catenina nel carcinoma endometriale*

**Coordinatrice Prof. Stefania Montagnani**

**Relatore:  
Dott. Luigi Insabato**

**Candidato:  
Dott. Rossella De Cecio**

**ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

# INDICE

INTRODUZIONE	3
MATERIALI E METODI	7
RISULTATI	9
DISCUSSIONE	11
FOTO	14 - 15
BIBLIOGRAFIA	16

## INTRODUZIONE

I meccanismi che regolano i processi di adesione cellulare sono stati oggetto di studio per la loro partecipazione nei fenomeni di motilità cellulare, riconoscimento e differenziamento e per il loro ruolo nella cancerogenesi

La famiglia delle molecole di adesione conta un elevato numero di componenti distinti in 2 grandi famiglie: molecole di adesione immunoglobulino-simile e le caderine.

La prima è coinvolta nei meccanismi della risposta immunitaria, la seconda nell'adesione cellulare che costituisce l'architettura dei tessuti solidi.

Queste sono dette molecole transmembrana per cui presentano un dominio extracellulare un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico.

Beta - catenina lega il dominio della porzione citoplasmatica (DST) della E-caderina, che a sua volta lega  $\alpha$ -catenina e quest'ultima insieme alle proteine (ZO-1- $\alpha$ -actina, vinculina) farebbe da punto di attacco del citoscheletro associandosi con i filamenti di actina.

La  $\gamma$ -catenina, proteina molto simile a beta-catenina sembra legarsi anch'essa al dominio DST facendo da ponte tra l'E-caderina e il citoscheletro.

Beta-catenina è regolata attraverso il pathway di Wnt.

Wnt è un fattore di crescita che durante l'embriogenesi svolge un ruolo fondamentale nella determinazione del destino cellulare.

La via regolatrice che parte da Wnt e coinvolge la  $\beta$ -catenina è definita "canonica" per il fatto che è stata la prima ad essere identificata e per gli importanti meccanismi in cui essa è coinvolta.

In assenza di un segnale mitotico proveniente dall'esterno,  $\beta$ -catenina viene sequestrata in un complesso formato da diverse sub unità proteiche comprendente le proteine APC (Adenomatous Polyposis Coli) glicogeno-sintasi-chinasi  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), fosfoprotein-fosfatasi 2A (PP-2A) e l'axina. (2)

Quando questo complesso è assemblato, la GSK- $3\beta$  catalizza la fosforilazione della  $\beta$ -catenina.

In seguito alla fosforilazione multipla, le molecole di  $\beta$ -catenina vengono distrutte, inviandole al proteosoma.

Questo meccanismo, in sinergia con il legame della  $\beta$ -catenina all'E-caderina, causa la presenza di bassi livelli di  $\beta$ -catenina libera a livello citosolico.

Quando il ligando Wnt lega il proprio recettore "frizzled" viene attivata, secondo un meccanismo non ancora del tutto chiaro, una proteina intracellulare (Dsh) la quale viene reclutata sulla membrana e destabilizza il complesso APC, GSK-3 $\beta$ , axina, che non è più in grado di fosforilare la  $\beta$ -catenina.

In conseguenza della diminuita fosforilazione della  $\beta$ -catenina aumenta la quantità citosolica della proteina, che si trasferisce nel nucleo legandosi ai fattori di trascrizione Lef-1 (Lymphocyte Enhancer Factor) e TCF (T-cell Factor). (1-3)

In seguito a queste interazioni viene regolata l'espressione di geni coinvolti nella migrazione cellulare.

Secondo alcuni studi recenti livelli di  $\beta$ -catenina aumentano esclusivamente secondo due possibilità: mutazioni del gene di  $\beta$ -catenina o mutazioni di APC, quest'ultimo è un gene soppressore tumorale, che presenta mutazioni nel 90% dei tumori del colon, il cui principale compito è quello di ridurre i livelli di  $\beta$ -catenina. (3)

Quando APC è mutato,  $\beta$ -catenina si accumula e penetra nel nucleo, dove può attivare direttamente il gene per la ciclina D1, ciò provoca una proliferazione cellulare incontrollata contribuendo all'insorgenza del tumore. (2)

Lo scopo della nostra ricerca è di verificare l'espressione di beta-catenina e confrontare i risultati tra carcinoma endometriale, iperplasia endometriale atipica e mucosa endometriale normale.

## MATERIALI E METODI

Abbiamo selezionato dal materiale di archivio (2006-07) 50 casi così suddivisi 30 casi di carcinoma endometriale, 10 casi di iperplasia complessa atipica, 10 casi di endometrio normale.

Le pazienti avevano un'età compresa tra 34-79 anni, età media 46.

Tutti i tumori sono stati asportati chirurgicamente ed esaminati presso il nostro Istituto.

Il follow-up medio e' stato di 12 mesi.

I campioni in esame sono stati fissati in formalina al 4% successivamente inclusi in paraffina, tagliati al microtomo ottenendo sezioni dello spessore di 4 – 5  $\mu\text{m}$ .

La diagnosi istologica è stata formulata su sezioni colorate con ematossilina-eosina.

Le rimanenti sezioni sono state montate su vetrini trattati con un collante costituito da una miscela di gelatina e cromo-potassio-solfato per indagine di immunohistochimica e sottoposti ad immunocolorazione.

La diagnosi di carcinoma endometriale è stata formulata in accordo con l'ultima classificazione della World Health Organization (WHO) per l'apparato genitale femminile.

In tutti i casi sono stati studiati i seguenti parametri:

1. Pleomorfismo cellulare
2. Conta mitotica
3. Necrosi

Su ogni campione è stato effettuato uno studio di immunoistochimica per  $\beta$ -catenina con anticorpo monoclonale NCL-B-CAT clone 17C2 della Novocastra a una diluizione di 1/200; abbiamo utilizzato la tecnica di smascheramento antigenico con pretrattamento in forno a microonde per 30' a 100 °C in tampone citrato con pH 6 .

In condizioni di normalità il segnale appare di membrana o citoplasmatico.

## RISULTATI

I 30 casi di carcinoma endometriale sono stati stadiati secondo il sistema TNM e FIGO: 27 casi in stadio I C e 3 casi in stadio III C.

La positività immunoistochimica è stata valutata applicando il seguente score:

positività inferiore all' 1% punteggio 0

positività tra 1% e 10% punteggio +

positività tra 10% e 50% punteggio ++

positività >al 50% punteggio +++.

### Espressione immunoistochimica di beta-catenina

Beta - catenina	Nucleare	Membrana	Citoplasmatica
Carcinoma endometriale	+++		++
Iperplasia endometriale atipica			++/+++
Endometrio normale		+++ (80%)	+ (20%)

L'espressione di  $\beta$ -catenina nel carcinoma endometriale (stadio I C) è risultata essere nucleare e citoplasmatica con score compreso tra +++ e ++; nei casi con linfonodi positivi (stadio III C) la positività immunohistochimica è risultata essere nucleare con score +++. (Fig.1 - 2 - 3 - 4)

Al contrario l'espressione di  $\beta$ -catenina nell'endometrio normale è risultata essere prevalentemente di membrana con score compreso tra +++ e ++. (Fig. 5 - 6)

Nell'iperplasia complessa atipica l'espressione immunohistochimica di  $\beta$ -catenina ha mostrato una positività prevalentemente citoplasmatica con score compreso tra ++/+++. (Fig. 7- 8)

## DISCUSSIONE

Beta-catenina è una proteina transmembrana con molte funzioni gioca un ruolo essenziale sia nell'adesione cellula-cellula mediata da E-caderina che nell'attivazione trascrizionale Wnt-mediata.

Nelle cellule quiescenti  $\beta$ -catenina è degradata rapidamente attraverso un meccanismo di fosforilazione che coinvolge il complesso glicogeno-sintasi-chinasi (GSK-3 $\beta$ -Axina-APC).

Quando si verifica un accumulo citoplasmatico di  $\beta$ -catenina, perché sfuggita al meccanismo di degradazione, ne risulta una traslocazione nel nucleo dove la proteina interagisce con fattori trascrizionali Tcf/LEF attivando l'espressione di vari geni come la ciclina D1 e c-myc.. (3-4-5)

Beta-catenina, isolata originariamente per la sua associazione con il dominio citoplasmatico delle caderine (molecole di adesione cellulare) ha, quindi, un ruolo significativo nel pathway di Wnt per il controllo della proliferazione e morte cellulare. (3)

Mutazioni di  $\beta$ -catenina sono state riportate in una grande varietà di tumori umani come il carcinoma del colon retto (4) il carcinoma gastrico, l'epatocarcinoma, il melanoma maligno, i tumori desmoidi, il craniofaringioma e il pilomatrixoma e sono considerati il risultato dell'accumulo nucleare di  $\beta$ -catenina con conseguente attivazione trascrizionale di Tcf/LEF ed espressione di geni che sono implicati nella tumorigenesi.

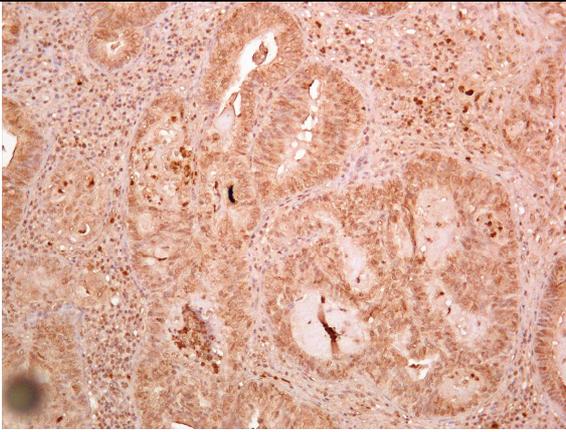
A nostra conoscenza, in letteratura sono stati riportati pochi studi di  $\beta$ -catenina nel carcinoma endometriale (6-8-9-10), non abbiamo trovato lavori di studi immunohistochimici relativi a beta-catenina e lesioni preneoplastiche endometriali.

Pertanto abbiamo valutato immunohistochimicamente  $\beta$ -catenina oltre che nel carcinoma endometriale anche in lesioni preneoplastiche dell'endometrio e nella mucosa endometriale normale. (10)

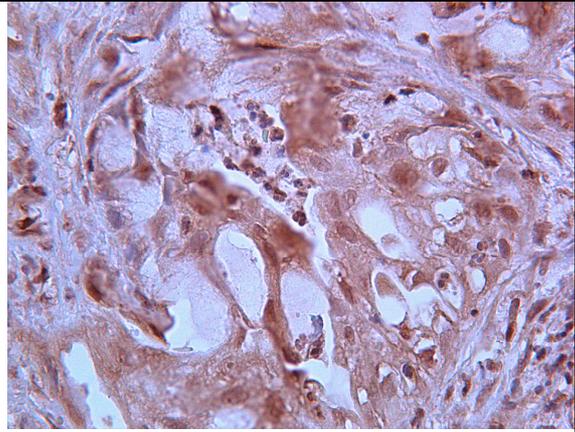
In questo studio abbiamo verificato come l'immunoreattività per  $\beta$ -catenina era sempre presente nel citoplasma delle cellule neoplastiche e che in molti casi, soprattutto nei 3 casi di ECA con linfonodi positivi, è stata riscontrata una positività nucleare a differenza di quanto osservato nell'endometrio normale dove la positività era di membrana (citoplasmatica).

Inoltre abbiamo verificato come nei casi di iperplasia endometriale complessa atipica il segnale immunohistochimico di  $\beta$ -catenina risultava essere citoplasmatico e solo in alcuni casi nucleare, soprattutto laddove si associavano aree di transizione verso il carcinoma.

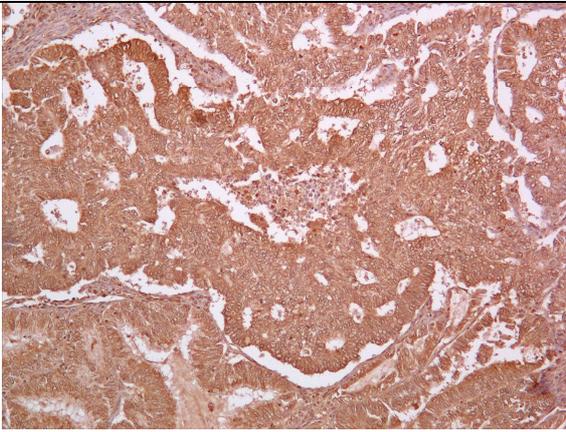
I nostri dati sono riferiti a una piccola casistica, pertanto meritano un ulteriore approfondimento con uno studio più ampio, nonostante ciò, anche alla luce di quanto emerso dalla letteratura scientifica, possiamo dire che l'accumulo nucleare (7) di  $\beta$ -catenina potrebbe essere l'espressione di una proliferazione cellulare incontrollata che contribuirebbe non solo allo sviluppo del tumore ma sarebbe responsabile anche di una maggiore aggressività della stessa neoplasia.



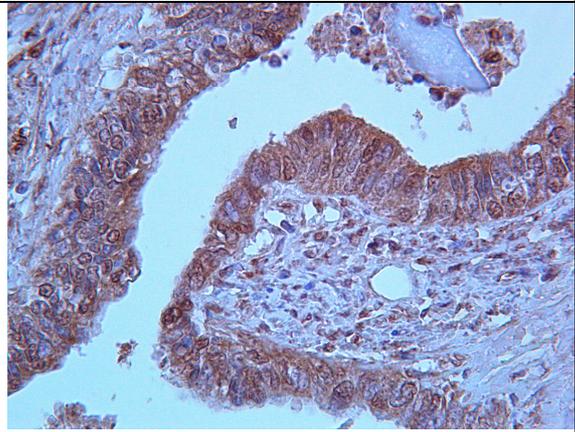
**Figura 1**



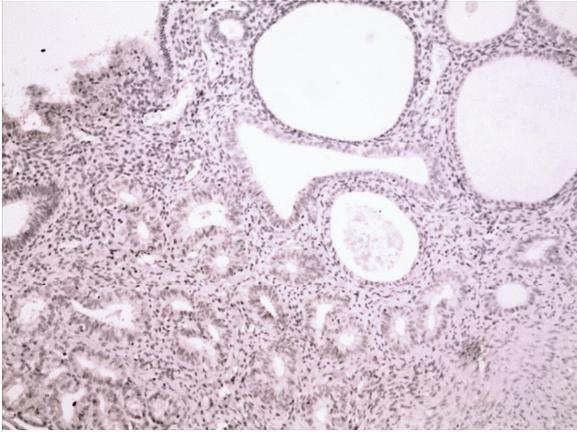
**Figura 3**



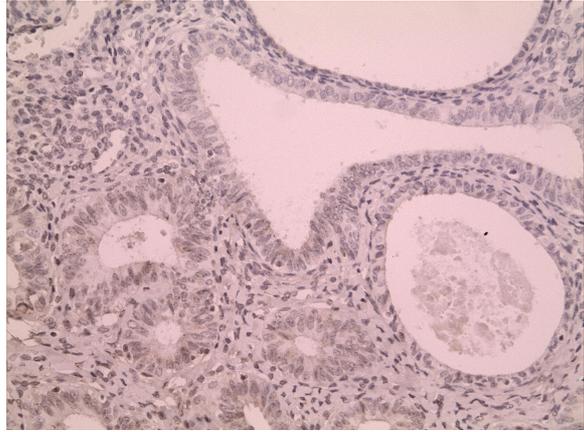
**Figura 2**



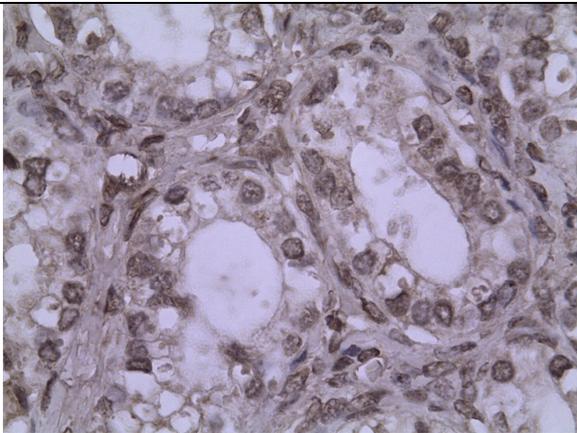
**Figura 4**



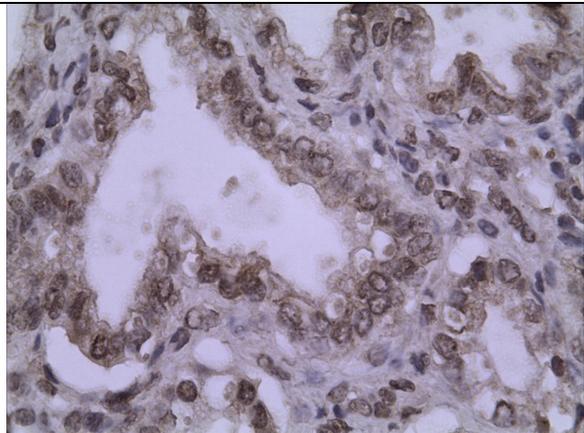
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**

## BIBLIOGRAFIA

1. Cara J, Gottardi and Barry M, Gumbiner, Distinct molecular forms of  $\beta$ -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes, *The Journal of Cell Biology*, 2004; Vol.167, No. 2: 339-349
2. Moreno-Bueno G, Hardisson D, et al., Abnormalities of the APC/ $\beta$ -catenin pathway in endometrial cancer, *Oncogene* 2002; 21: 7981-7990
3. Kumamoto H, Ooya K, Immunohistochemical detection of  $\beta$ -catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas, *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 401-6
4. Castellone M D, Teramoto H, Gutkind J S, Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer Chemoprevention: The  $\beta$ -Catenin Connection, *Cancer Res* 2006; 66: (23) 11085-88
5. Clevers H, Colon Cancer- Understanding How NSAIDs Work, *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354(7): 761-763
6. Scholten A.N., Aliredjo R., Creutzberg C.L., Smit V.T.H.B.M., Combined E-cadherin,  $\alpha$ -catenin expression is a favourable prognostic factor in endometrial carcinoma *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1379-1385
7. Kobayashi M., Honma T., Matsuda Y., et al., Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer *Br J Cancer* 2000; 82: 1689-93
8. Athanassiadou P., Athanassiades P., et al., The prognostic value of PTEN, p53, and beta-catenin in endometrial carcinoma: a prospective immunocytochemical study *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 697-704
9. Saeguta M., Hashimura M., Kuwata T., Hamano M., Wani Y. and Okayasu I., A functional role of Cdx2 in  $\beta$ -catenin signaling during transdifferentiation in endometrial carcinomas *Carcinogenesis* 2007; Vol.28 No.9: 1885-1892
10. Monaghan H., MacWhinnie N. & Williams A.R.W., The role of matrix metalloproteinases-2, -7 and -9 and  $\beta$ -catenin in high grade endometrial carcinoma *Histopathology* 2007; 50: 348-357