

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Ostetriche e Ginecologiche

Ciclo XXIII

ESPRESSIONE, LOCALIZZAZIONE E CORRELAZIONE
CLINICO-PATOLOGICA DELLA MASPINA (MAMMARY
SERINE PROTEASE INHIBITOR) NEL CARCINOMA
ENDOMETRIALE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Alberto Bacchi Modena

Tutor:
Chiar.mo Prof. Giovanni Piantelli

Dottorando: Dott. Carlo Saccardi.

INDICE

INTRODUZIONE	5
MATERIALI E METODI	8
RISULTATI	12
DISCUSSIONE	16
BIBLIOGRAFIA	22

ABSTRACT:

INTRODUZIONE: La maspina è una proteina appartenente alla famiglia delle serpine, la cui espressione è alterata nei tumori di vari organi e tessuti. Anche nel carcinoma endometriale è presente la maspina, ma non è chiaro se esista una relazione tra la sua presenza, concentrazione e localizzazione intracellulare e l'aggressività tumorale. Scopo di questo studio è stato quello di analizzare l'espressione della maspina nell'adenocarcinoma endometriale, e valutare se tale proteina possa essere utile come indicatore di aggressività tumorale, correlandone l'espressione con un marcatore di proliferazione cellulare (KI-67) e con la p53

MATERIALI E METODI: L'espressione della maspina, della p53 e del KI-67 è stata valutata mediante tecnica immunohistochimica su preparati istologici relativi a 107 casi di adenocarcinoma endometriale, a 76 casi con evidenza istologica di iperplasia endometriale tipica o atipica e 24 casi di endometrio normale. L'espressione delle tre proteine è stata correlata tra i diversi gruppi, e, nei casi di adenocarcinoma endometriale, con il grado di differenziazione istologica e con lo stadio FIGO 2009.

RISULTATI: Non è stata osservata espressione della maspina nel tessuto endometriale normale e in percentuale molto bassa (14.3%) nei casi di iperplasia endometriale tipica. Molti casi di iperplasia endometriale atipica e di adenocarcinoma endometriale, invece, sono risultati positivi (rispettivamente il 45% e il 48.6%), ma non si sono evidenziate correlazioni significative tra l'espressione della maspina e il grado di differenziazione istologico o lo stadio tumorale. Tutti i 9 (17.3%) casi in cui è stata osservata l'espressione della maspina a livello nucleare appartenevano all'adenocarcinoma endometriale in stadio IA. Nei casi che esprimevano maspina, non sono emerse associazioni significative tra la percentuale di espressione della maspina e la p53 o la KI-67.

CONCLUSIONI: Da questo studio emerge che l'espressione della maspina nelle cellule endometriali correla con l'iperplasia atipica e con l'adenocarcinoma endometriale, e può quindi giocare un ruolo nella trasformazione neoplastica dell'endometrio. La maspina è espressa in maniera significativamente più elevata nell'iperplasia endometriale atipica rispetto a quella tipica, e questo potrebbe rivelarsi un utile ausilio in presenza di quadri anatomo-patologici di dubbia interpretazione. E' stato confermato inoltre che l'espressione di maspina a livello nucleare correla con bassi stadi di malattia, potendo quindi avere un ruolo nella valutazione della prognosi delle pazienti.

INTRODUZIONE

Il carcinoma endometriale è il più comune tumore ginecologico nei paesi industrializzati, con sopravvivenza a 5 anni, considerando tutti gli stadi, di circa l'80%. L'adenocarcinoma endometriode rappresenta più dell'80% dei casi, e tipicamente viene diagnosticato in stadi precoci (80-85% stadio I), a basso grado e con outcomes favorevoli (in questi casi con sopravvivenza a 5 aa maggiore del 90%).^{1,2} Il trattamento è principalmente chirurgico (più o meno chemio e/o radioterapia), e l'analisi del pezzo operatorio permette di stabilire con accuratezza i fattori istologici prognostici, quali grading, infiltrazione miometriale, infiltrazione degli spazi linfovaskolari, diffusione extrauterina ed interessamento linfonodale, oltre ovviamente alla stadiazione della malattia, recentemente rivista dalla FIGO nel 2009.³⁻⁵ Al di là dei fattori prognostici clinico-patologici, numerosi biomarkers quali i recettori per estrogeni/progesterone, bcl-2, catenina, Her2/neu e p53 si sono dimostrati utili nel predire la prognosi in donne affette da carcinoma endometriale.^{2,6}

La Maspina (MAMmary Serine Protease INhibitor) o SERPINB5 fa parte della famiglia delle Serpine o inibitori delle Serin-proteasi, identificata come onco-soppressore nel 1994 nelle cellule epiteliali della ghiandola mammaria.⁷ Il gene è localizzato sul cromosoma 18q21.3 e codifica per una proteina di 42kD⁸ con funzione onco-soppressiva tramite la sua azione di inibizione sulla motilità cellulare, invasione, metastatizzazione ed angiogenesi, e con effetto di stimolo sull'adesione cellulare.⁸⁻¹² Nonostante le prime osservazioni ipotizzassero che una ridotta espressione della maspina fosse associata con la progressione tumorale ed una cattiva prognosi, studi successivi hanno rivelato come questa correlazione sia decisamente più complessa di quanto si credesse inizialmente. La Maspina è presente nell'epitelio di molti organi normali, quali la mammella, la prostata ed il cavo orale, e in questi tessuti la riduzione

della sua espressione, frequentemente osservata in caso di modificazione neoplastica, è stata associata a maggior aggressività tumorale e più frequente metastatizzazione.^{11,13-15}

Al contrario, in altri organi ove non è presente nel tessuto sano, come nel pancreas e nello stomaco, la sua presenza e l'iper-espressione genica è stata associata a maggior aggressività tumorale ed a maggior rischio di recidiva e metastasi.^{16,17} In questi tessuti, quindi, la maspina sembra avere effetto oncogeno piuttosto che oncosoppressore. Si sa, dunque, che l'espressione della maspina si modifica in caso di trasformazione neoplastica e può correlare con l'aggressività tumorale e, di conseguenza, con la prognosi del paziente. Non c'è però accordo in letteratura circa l'espressione della stessa e la correlazione con la prognosi migliore o peggiore, essendoci dati contrastanti tra studi condotti in vitro ed in vivo, tra diversi organi e tessuti, e anche rispetto agli stessi organi.^{13,18} Questa differenza nei risultati delle osservazioni scientifiche potrebbe essere spiegata da una sorta di organo/tessuto specificità dell'espressione della maspina o dall'influenza di distinte localizzazioni subcellulari (nucleare o citoplasmatica) di questa proteina nelle cellule tumorali.¹⁹ Anche per quanto riguarda i tumori di interesse ginecologico sono state riportate evidenze contrastanti. La maspina sembra essere iperespressa nei carcinomi ovarici, laddove la sua concentrazione è stata messa in relazione ad una maggiore aggressività, mentre nel carcinoma cervicale è stato osservato un andamento opposto: una riduzione significativa della sua espressione pare correlare con l'aumentare dell'invasività dello stesso.^{20,21} Il tessuto endometriale sano non sembra esprimere maspina. Recenti evidenze hanno messo in luce come, nel carcinoma endometriale, l'espressione della maspina sia presente, anche se non è chiaro se esista una relazione tra la sua presenza, concentrazione e localizzazione intracellulare e l'aggressività tumorale.^{22,23}

Scopo dello studio è stato quello di analizzare l'espressione della maspina nell'adenocarcinoma endometriale, e valutare se tale proteina possa essere utile come

indicatore di aggressività tumorale, correlandone l'espressione con un marcatore di proliferazione cellulare (KI-67) e con la p53.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su preparati istologici relativi a 107 pazienti sottoposte ad intervento chirurgico, consecutivamente nell'arco di 4 anni, per adenocarcinoma endometriale, a 76 donne con evidenza istologica di iperplasia endometriale (tipica o atipica) e 24 donne con endometrio normale. Di tutte le pazienti sono stati registrati l'età, lo stato pre- o post-menopausale e la presenza in anamnesi di diabete mellito o ipertensione arteriosa. Le pazienti affette da carcinoma endometriale erano state trattate chirurgicamente in modo adeguato in accordo con le linee guida per il trattamento dei tumori ginecologici della Federazione Internazionale di Ginecologia ed Ostetricia (FIGO) 2000.²⁴ La malattia è stata stadiata sulla base dell'evidenza anatomo-patologica secondo la stadiazione rivista per il carcinoma endometriale FIGO 2009⁵. E' stato inoltre registrato il grado di differenziazione istologico delle lesioni neoplastiche. Per tutti gli altri casi (iperplasia endometriale o endometrio normale) il materiale analizzato è stato costituito da preparati istologici di biopsie endometriali, eseguite ambulatorialmente in corso di isteroscopia diagnostica. Di ogni caso, è stato selezionato il preparato istologico in ematossilina-eosina piu' rappresentativo (Figura 1) ed usato il corrispondente blocchetto in paraffina.

IMMUNOISTOCHEMICA

Da ciascun blocchetto, sono state tagliate al microtomo sezioni dello spessore di 4 micron da colorare con metodica immunoistochimica. Gli anticorpi utilizzati sono stati: maspina (anticorpo monoclonale, diluizione 1:25-1:50; clone EAW24, Novocastra laboratories ltd, Newcastle upon Tyne, UK); p53 (anticorpo monoclonale, diluizione 1:25-1:50; clone DO-7; Dakocytomation, Glostrup, Denmark); Ki67 (anticorpo monoclonale, diluizione 1:100, clone MIB-1, Dako-cytomation, Glostrup, Denmark).

Inizialmente tutte le sezioni sono state poste al microonde (750 W) per 20 minuti in un buffer citrato (10 mM pH 6.0) per lo smascheramento antigenico.

Per la maspina, le sezioni sono state successivamente preincubate con super block (Biogenex) per 5 minuti per bloccare la colorazione di fondo non specifica e quindi incubate per 45 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo primario; in seguito le medesime sezioni sono state incubate con EnvisionSystem HRP mouse (Dako, Denmark) per 30 minuti.

Per gli altri anticorpi (p53 e Ki-67), le sezioni sono stati incubate dapprima con anticorpi secondari prediluiti e biotinilati per 20 minuti (Biogenex HRP, USA), e poi con il complesso streptavidina-perossidasi per ulteriori 20 minuti (Biogenex HRP, USA). Negli intervalli tra i periodi di incubazioni, le sezioni sono state lavate con PBS (pH 7.00) per 3 minuti.

Il colore è stato sviluppato utilizzando 3.3- diaminobenzidina (Dako, Denmark) per 4 minuti. Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Meyer.

La valutazione dell'espressione immunoistochimica per i tre anticorpi è stata semiquantitativa. Per Ki-67 e p53 sono state considerate positive solo le cellule con marcatura nucleare. Per tutti e tre gli anticorpi utilizzati (maspina, Ki-67 e p53), si è espressa la positività come percentuale di cellule positive su una conta di almeno 500 cellule totali in almeno 10 campi (ingrandimento 400x).

Per quanto riguarda la maspina, inoltre, si è valutato il principale pattern di espressione (citoplasmatico o nucleare) indicando la percentuale di cellule positive con pattern nucleare sul totale delle cellule positive (Figura 2).

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS per Windows versione 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Le variabili categoriche sono espresse come numerosità (percentuale), le variabili continue sono espresse come media (deviazione

standard) o come mediana (range) quando più appropriato. L'associazione tra le variabili cliniche, l'evidenza istologica, il grading e la stadiazione FIGO con la presenza e localizzazione della maspina è stata valutata utilizzando il χ^2 di Pearson o il test esatto di Fisher quando necessario. L'eventuale correlazione tra l'evidenza istologica, il grading e la stadiazione FIGO con la percentuale di espressione della maspina, della Ki-67 e della p53 è stata analizzata con il test di Kruskal-Wallis con l'analisi post-hoc di Dunn (per confronti tra più gruppi) e con il test U di Mann Withney (per confronti fra 2 gruppi).

Un valore di $p < 0.05$ è stato accettato come statisticamente significativo.

Figura 1: Adenocarcinoma endometrioido dell'endometrio ben differenziato (G1), con invasione dei primi fasci miometriali (stadio FIGO 2009: 1A)
Colorazione in ematossilina-eosina; ingrandimento 31x

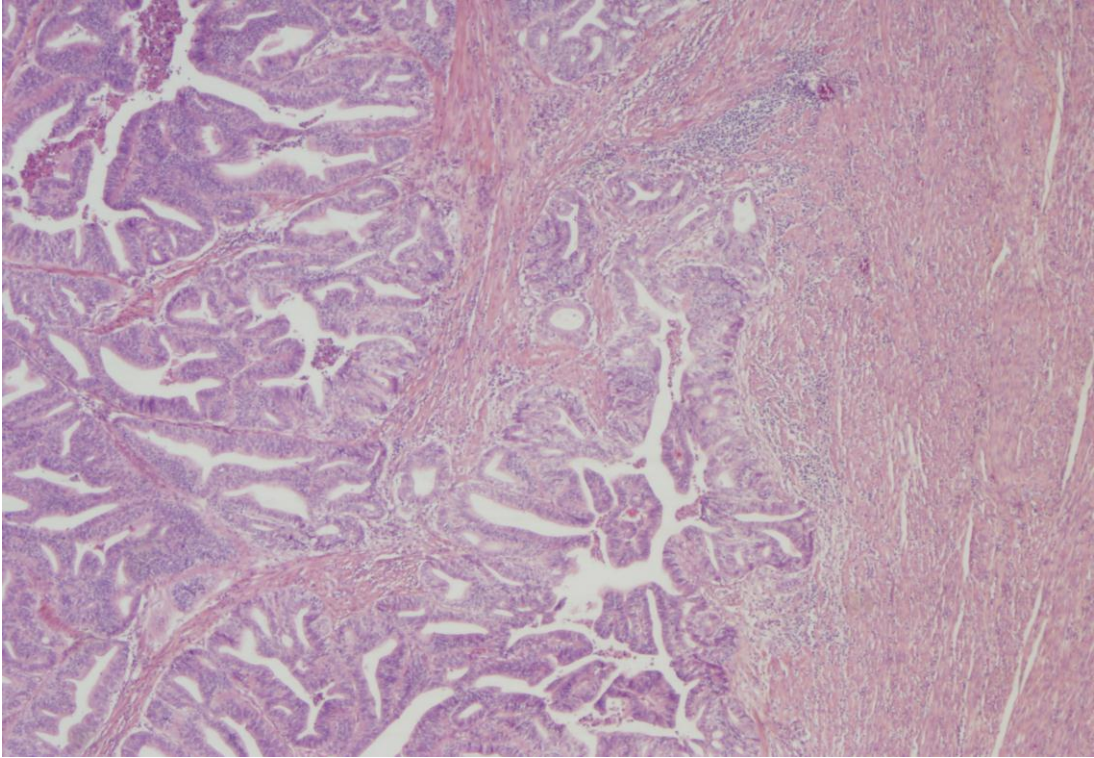
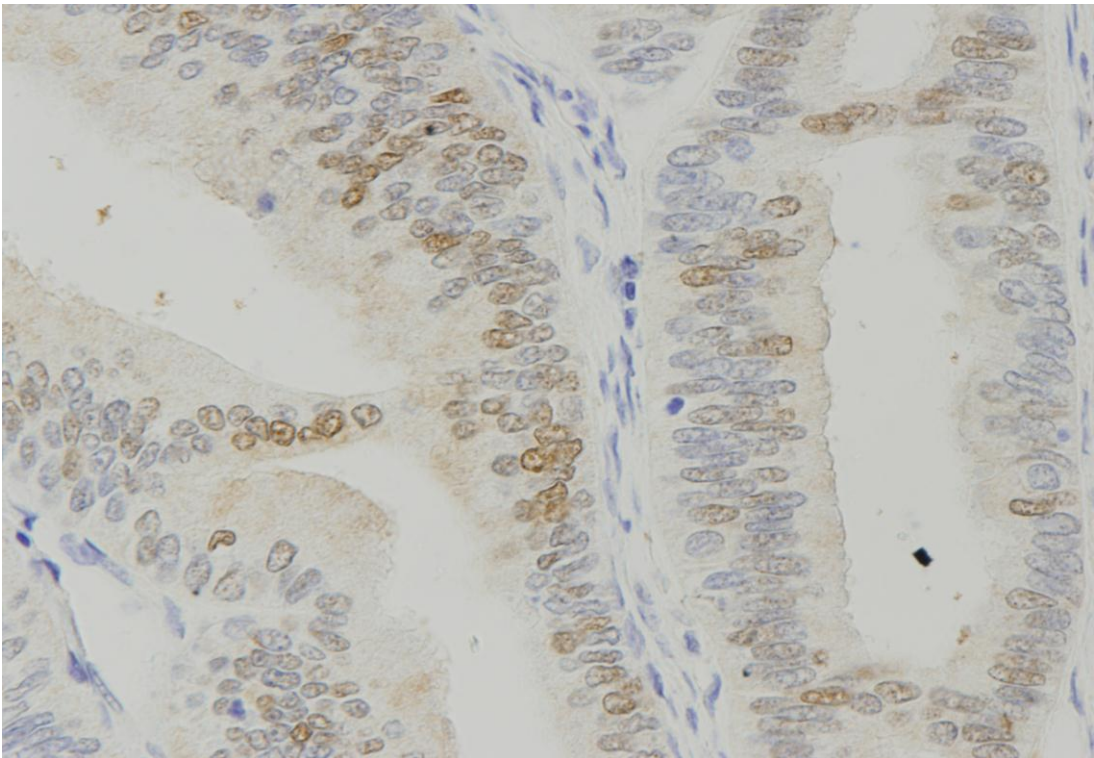


Figura 2: Espressione nucleare della maspina, ingrandimento 320 X



RISULTATI

Sono stati analizzati i preparati istologici di 207 donne. L'età media era di 60.85 ± 10.96 anni e 161 (77.7%) erano in menopausa. Delle 107 pazienti con diagnosi di adenocarcinoma endometriale, 7 (6.5%) erano affette anche da diabete mellito e 47 (43.9%) avevano una diagnosi di ipertensione arteriosa.

Secondo la stadiazione FIGO 2009 sono state classificate come IA 64 (59.8%) pazienti, IB 32 (29.9%), al II stadio 10 (9.3%) donne e al IIIA solo 1 (0.9%) paziente. Quarantotto (44.9%) lesioni sono state classificate con buon grado di differenziazione (grading 1), 52 (48.6%) con moderato (grading 2) e 7 (6.5%) con scarso grado di differenziazione (grading 3) (Tabella1). In 4 (3.7%) casi il washing peritoneale è risultato positivo per cellule neoplastiche.

Tabella 1: stadiazione FIGO 2009 e grading delle 107 pazienti con adenocarcinoma endometriale

		GRADING			TOTALE
		1	2	3	
STADIO FIGO	1A	36 (56.3%)	24 (37.5%)	4 (6.3%)	64
	1B	10 (31.3%)	20 (62.5%)	2 (6.3%)	32
	2	2 (20%)	7 (70%)	1 (10%)	10
	3A	-	1 (100%)	-	1
TOTALE		48 (44.9%)	52 (48.6%)	7 (6.5%)	107

Delle 76 donne con iperplasia endometriale, 20 (26.3%) avevano un'iperplasia atipica e in 56 (73.7%) casi è stata osservata un'iperplasia semplice o complessa, ma senza atipie.

Non sono state identificate correlazioni significative tra le variabili cliniche anamnestiche (diabete mellito e/o ipertensione arteriosa) e l'espressione e concentrazione della maspina.

Nel tessuto endometriale sano non è stata osservata espressione della Maspina, nell'iperplasia endometriale senza atipie l'espressione della Maspina è stata osservata solo nel 14.3% dei casi, mentre nell'iperplasia endometriale atipica e nell'adenocarcinoma endometriale si è osservata l'espressione della Maspina rispettivamente nel 45% e 48.6% dei casi; la differenza tra l'espressione della proteina tra tessuto sano ed iperplasia senza atipie è risultata non significativa ($p=0.1$), mentre è risultata significativa la differenza tra tessuto sano e iperplasia atipica, e tra tessuto sano e adenocarcinoma endometriale (rispettivamente $p<0.0002$ e $p<0.0001$), ed è risultata significativa anche la differenza tra iperplasia senza atipie e iperplasia atipica, e tra iperplasia senza atipie e carcinoma endometriale (rispettivamente $p<0.01$ e $p<0.0001$); non è stata riscontrata differenza significativa tra iperplasia atipica ed adenocarcinoma endometriale ($p=0.81$) (tabella 2).

Tabella 2: presenza della maspina nell' endometrio sano, nell' iperplasia endometriale e nell'adenocarcinoma endometriale

	MASPINA		TOTALE
	NO	SI	
ENDOMETRIO NORMALE	24 (100%)	-	24
IPERPLASIA ENDOMETRIALE SENZA ATIPIE	48 (85.7%)	8 (14.3%)	56
IPERPLASIA ENDOMETRIALE ATIPICA	11 (55%)	9 (45%)	20
ADENOCARCINOMA ENDOMETRIALE	55 (51.4%)	52 (48.6%)	107
TOTALE	138 (66.7%)	69 (33.3%)	207

Differenza tra endometrio normale e iperplasia endometriale senza atipie $p=0.1$

Differenza tra endometrio normale e iperplasia endometriale atipica $p<0.0002$

Differenza tra endometrio normale e adenocarcinoma endometriale $p<0.0001$

Differenza tra iperplasia endometriale senza atipie e iperplasia endometriale atipica $p<0.01$

Differenza tra iperplasia endometriale senza atipie ed adenocarcinoma endometriale $p<0.0001$

Differenza tra iperplasia endometriale atipica ed adenocarcinoma endometriale $p=0.81$

Non sono state osservate differenze significative nell'espressione della maspina in relazione al grado di differenziazione istologico (tabella 3).

Tabella 3: correlazione tra grado di differenziazione ed espressione della maspina

	MASPINA		TOTALE
	NO	SI	
BEN DIFFERENZIATO (grading 1)	23 (47.9%)	25 (52.1%)	48
MODERATAMENTE DIFFERENZIATO (grading 2)	27 (51.9%)	25 (48.1%)	52
SCARSAMENTE DIFFERENZIATO (grading 3)	5 (71.4%)	2 (28.6%)	7
TOTALE	55 (51.4%)	52 (48.6%)	107

L'espressione della maspina a livello nucleare è stata osservata solo in 9 (17.3%) casi di adenocarcinoma endometriale, e tutti appartenevano allo stadio 1A, in nessun caso con stadiazione superiore è stata osservata espressione di maspina nucleare. Questa differenza è risultata statisticamente significativa ($p < 0.01$).

Nei casi che esprimevano maspina, la percentuale di cellule positive alla proteina non differiva significativamente tra iperplasia endometriale e adenocarcinoma endometriale, anche se è stato possibile riconoscere un trend in crescita (tabella 4). L'espressione di KI-67 e p53 è risultata significativamente più alta nell'adenocarcinoma endometriale rispetto al tessuto sano, rispettivamente di 10.5 ± 15 e 7.1 ± 17.6 nell'adenocarcinoma endometriale e 3.3 ± 8.4 e 1.3 ± 4.1 nel tessuto sano (tabella 4).

Tabella 4: espressione percentuale della maspina, KI 67 e p53 nell'endometrio normale, iperplasia endometriale tipica, iperplasia endometriale atipica e adenocarcinoma endometriale

	MASPINA (%)	KI-67 (%)*	p53 (%)**
ENDOMETRIO NORMALE	-	3.3 ± 8.4	1.3 ± 4.1
IPERPLASIA SENZA ATIPIE NUCLEARI	6.2 ± 6.7	7.9 ± 11.0	1.3 ± 2.8
IPERPLASIA ATIPICA	8.9 ± 9.8	6.2 ± 10.5	1.3 ± 1.8
ADENOCARCINOMA ENDOMETRIALE	9.1 ± 8.4	10.5 ± 15.0	7.1 ± 17.6

dati espressi come media ± deviazione standard

* differenza tra endometrio normale e adenocarcinoma endometriale $p < 0.01$

** differenza tra adenocarcinoma endometriale ed endometrio normale, iperplasia senza atipie e iperplasia atipica $p < 0.01$

Non sono emerse associazioni significative tra l'espressione percentuale della maspina, del KI-67 ed della p53 con lo stadio FIGO 2009, anche se è stato osservato un trend in crescita della KI-67 e della p53 all'aumentare dello stadio, così come l'espressione della maspina e del KI-67 non hanno evidenziato correlazioni significative col grading, mentre la p53 ha dimostrato una crescita significativa all'aumentare del grado di differenziazione istologico: G1 2.5 ± 5.4 ; G2 8.6 ± 19 ; G3 27.3 ± 26.3 , $p < 0.01$

DISCUSSIONE

Il carcinoma dell'endometrio rappresenta la più frequente neoplasia maligna di interesse ginecologico nei paesi sviluppati, e sebbene tipicamente venga diagnosticato in stadi iniziali, e conseguentemente le percentuali di mortalità non siano molto elevate, rappresenta la decima causa di morte per tumore nel sesso femminile, secondo solo al carcinoma ovarico nel campo dell'oncologia ginecologica.¹ Ciononostante, il carcinoma endometriale ha ricevuto meno attenzioni da parte dell'opinione pubblica e della comunità scientifica, rispetto al carcinoma del collo dell'utero o al carcinoma ovarico.

Il gene della maspina è stato originariamente identificato nell'epitelio mammario, e codifica per una proteina con supposta attività onco-soppressiva. Molti studi hanno dimostrato come questa proprietà sia legata alla capacità di inibire la motilità cellulare aumentando l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare.^{10,12,25} Questa sua azione sembra essere regolata mediante l'associazione della maspina alla integrina $\beta 1$ ed all'attivatore del plasminogeno urochinasi-type assieme al suo recettore, a livello dell'interfaccia membrana cellulare-matrice extracellulare. In assenza della maspina, l'attivatore del plasminogeno urochinasi-type legato al proprio recettore, si associa all'integrina $\beta 1$, attivando una cascata di segnali che facilita la proliferazione cellulare e la migrazione cellulare aumentando le metalloproteinasi della matrice extracellulare. L'espressione della maspina e la sua associazione al complesso attivatore del plasminogeno-recettore-integrina determinerebbe un'alterazione del complesso stesso inducendo una cascata di segnali che porta all'incremento dell'adesione cellulare e ad una conseguente inibizione della migrazione.²⁶ Studi recenti hanno però dimostrato come l'espressione della maspina abbia un comportamento non univoco, essendoci evidenze che confermano l'attività onco-soppressiva della maspina

ed altre che, all'opposto, dimostrano a suo carico un'attività di tipo oncogenico.^{13,15,17,18}

Solo quattro lavori scientifici hanno indagato, ad oggi, l'espressione e la localizzazione intracellulare della maspina nel carcinoma endometriale,^{22,23,27,28} con risultati in parte contrastanti.

In questo studio abbiamo osservato l'espressione della maspina nel 48.6% dei casi di adenocarcinoma endometriale e nel 45% dei casi di iperplasia endometriale atipica, mentre nell'iperplasia endometriale senza atipie la maspina era presente solo nel 14.3% dei casi e completamente assente nell'endometrio normale. Questi risultati appaiono in accordo con la letteratura presente confermando che nel caso dell'adenocarcinoma endometriale l'espressione della maspina sembra essere associata con modificazioni morfologiche quali la metaplasia, la displasia e la dedifferenziazione cellulare.²² Questo rappresenta comunque il primo studio in cui è stata valutata l'espressione della maspina nell'iperplasia endometriale tipica ed atipica, dimostrando come la maspina sia espressa in un numero minimo di casi di iperplasia endometriale senza atipie (14.3%), senza differenze significative tra iperplasia semplice e complessa, e senza differenze significative con l'endometrio normale, mentre l'espressione di questa proteina risulta significativamente aumentata nell'iperplasia endometriale atipica (45%), e questa espressione non differisce dai casi di adenocarcinoma endometriale. Questo potrebbe indicare che l'espressione della maspina sia incrementata nelle cellule endometriali con atipie nucleari. Vari studi hanno dimostrato un'elevata variabilità intra- ed inter-operatore nella diagnosi dell'iperplasia atipica, soprattutto nel caso di complessità architetturale ghiandolare (iperplasia complessa atipica), evidenziando un'area di difficoltà diagnostica con possibili conseguenze cliniche, soprattutto nei casi di pazienti giovani.^{29,30} La valutazione dell'espressione della maspina potrebbe quindi rivelarsi un utile ausilio in

quei casi in cui non risulta agevole discriminare tra iperplasia endometriale tipica, semplice o complessa, da quelli con atipie nucleari, soprattutto se complessa. Questa ipotesi necessita però di ulteriori studi e valutazioni.

Tsuji T, in una lettera all'editore nel 2007, riportava come l'espressione della maspina, in un'analisi di 96 casi di carcinoma endometriale, risultasse significativamente correlata con la profondità di invasione miometriale, con lo stadio FIGO e con la presenza di metastasi linfonodali, mentre non erano state rilevate differenze significative relativamente al grading.²⁷ In una recente analisi del 2011, invece, Torres A, pur confermando che la maspina viene iper-espressa nei casi di adenocarcinoma endometriale rispetto ai controlli sani, non è riuscito a dimostrare correlazioni significative tra la sua espressione e il grado di differenziazione cellulare o la profondità di infiltrazione miometriale.²⁸

Nel nostro studio non abbiamo trovato associazioni significative tra l'espressione della maspina e la presenza di diabete mellito o ipertensione arteriosa nella storia delle pazienti, così come non sono state osservate correlazioni significative con il grado di differenziazione, lo stadio FIGO 2009 e la presenza di citologia positiva nel lavaggio peritoneale, sottolineando come, pur confermando che la maspina viene iperespressa nelle cellule endometriali tumorali, non è ancora chiaro come la stessa agisca nella regolazione delle funzioni di queste cellule.

E' stato osservato come, nei casi di tumore dove la maspina era iperespressa, la localizzazione nucleare era spesso associata ad una prognosi migliore, mentre la localizzazione citoplasmatica era spesso associata ad un comportamento più aggressivo.^{19,23,31} Anche nel nostro studio, sebbene la maspina a livello nucleare fosse espressa solamente nei casi di adenocarcinoma endometriale, in tutti i casi si trattava di tumore allo stadio 1A, confermandone l'associazione con una minore aggressività tumorale.

L'espressione della maspina sembra essere regolata da fattori epigenetici e trascrizionali.⁹ Proprio per indagare il ruolo dell'espressione della maspina nella storia naturale dell'adenocarcinoma endometriale abbiamo osservato se vi fossero correlazioni tra l'espressione del gene della maspina e l'espressione della p53 ed il KI67. Il gene p53, conosciuto anche come "guardiano cellulare", codifica per la proteina p53, un fattore di trascrizione che regola la proliferazione cellulare. Nelle cellule normali si trova a concentrazioni molto basse. L'attivazione della p53 viene indotta da danni al DNA, dall'ipossia o dalla perdita di segnali di proliferazione.³² Le mutazioni del gene p53 sono eventi frequenti nei tumori. L'iperespressione della p53 a livello nucleare rappresenta una comune conseguenza della mutazione a carico del gene ed è quindi considerato un marker di mutazione cellulare. Vari studi hanno analizzato l'espressione della p53 nel carcinoma endometriale, correlandola con il grado istologico, la stadiazione FIGO, l'istotipo e l'outcome a lungo termine, ma i risultati sono ancora inconsistenti.^{34,35} L'espressione della p53 è stata implicata nella regolazione della maspina nei tumori solidi: nel tumore della mammella e della prostata la p53 sembra essere in grado di attivare l'espressione della maspina legandosi direttamente al promotore del gene, nel caso del tumore ovarico invece, la regolazione dell'espressione della maspina sembrerebbe essere un processo complesso, multifattoriale, controllato sia da processi p53-dipendenti che indipendenti.³⁶ Nel nostro studio abbiamo osservato l'iperespressione della p53 nell'adenocarcinoma endometriale, un incremento della stessa all'aumentare del grado di differenziazione istologica, ed un trend in crescita all'aumentare dello stadio FIGO 2009, mentre non si sono osservate correlazioni significative tra espressione della maspina e percentuale di p53 nucleare. Anche per quanto riguarda il carcinoma endometriale quindi, come nel tumore ovarico, probabilmente l'espressione della maspina è regolata da fattori complessi, indipendenti o solo parzialmente dipendenti dalla p53.

Zhu C e Suthipintawong C hanno indagato l'espressione ed il significato prognostico di numerosi biomarcatori nel carcinoma endometriale, tra cui la p53 e il KI-67. Mentre Zhu C concludeva dimostrando una correlazione tra l'espressione di p53 e KI-67 con lo stadio clinico ed il grado istologico, nello studio di Suthipintawong C non è stata osservata significatività statistica in relazione alla sopravvivenza per la p53, ma il KI-67 si è rivelato un indicatore prognostico indipendente di ricorrenza di malattia.^{37,38}

Ki-67 è una proteina nucleare coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare ed è essenziale per la sintesi dell'RNA ribosomiale. La sua espressione permette di individuare le cellule in attiva replicazione ed è quindi utilizzata come marker di proliferazione cellulare. Elevate percentuali di KI-67 e p53 sono state osservate in tumori endometriali con caratteristiche clinico-patologiche aggressive, suggerendo per queste proteine un potenziale ruolo prognostico negativo, ma tutti gli studi fin'ora eseguiti non hanno ancora messo in luce un chiaro significato clinico per la loro valutazione.³⁹ Vi è scarsa letteratura che associ l'espressione di Ki-67 e mspina. E' stato ipotizzato, analogamente a quanto osservato con la p53, che mspina e KI-67 condividano lo stesso meccanismo di espressione, ma gli studi presenti sono scarsi e non conclusivi.⁴⁰ Nel nostro studio non abbiamo osservato correlazioni significative tra l'espressione del KI-67, la p53 e la mspina, evidenziando come, se una qualche condivisione dei meccanismi d'azione esiste tra queste tre proteine, la sua dimostrazione e l'eventuale significato prognostico nell'adenocarcinoma endometriale rimane ancora da svelare.

In conclusione questo studio conferma che l'espressione della mspina nelle cellule endometriali è indice di trasformazione neoplastica, e sottolinea per la prima volta come la mspina sia espressa in un'elevata percentuale di casi di iperplasia endometriale con atipie nucleari, a differenza dell'iperplasia tipica ove è espressa in una

percentuale molto bassa di casi. Questo potrebbe acquisire un certo interesse in campo terapeutico in presenza di quadri anatomo-patologici di dubbia interpretazione. E' stato confermato inoltre che l'espressione di maspina a livello nucleare correla con bassi stadi di malattia, potendo quindi avere un ruolo nella valutazione della prognosi delle pazienti. La valutazione della densità cellulare percentuale di maspina non ha dimostrato associazioni significative con le caratteristiche anatomo-patologiche del campione, ne è satato possibile individuare un legame tra la percentuale di maspina e l'espressione della p53 o del KI-67, ad indicare che, nel tessuto endometriale, se vi sono condivisioni nei meccanismi di espressione di queste tre proteine coinvolte nel controllo della moltiplicazione e migrazione cellulare, questi necessitano di ulteriori conferme.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. Di Cristofano A., Ellenson L.H. Endometrial Carcinoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2007;2:57-85
3. ACOG Practice bulletin. Clinical management guidelines for obstetricians-gynecologists: management of endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 2005;106:413-425
4. Part J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:649-662
5. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105(2):103-104
6. Doll A., Abal M., Rigau M., et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer – new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;108:221-229
7. Zou Z., Anisowicz A., Hendrix M.J., et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 1994;263:526-529
8. Schaefer J.S., Zhang M. Role of Maspin in tumor metastasis and angiogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3:653-658
9. Sheng S. The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer. *Front Biosci* 2004;9:2733-2745
10. Bailey C.M., Khalkhali-Ellis Z., Seftor E.A., Hendrix M.J. Biological functions of MASPIN. *J Cell Physiol* 2006;209:617-624
11. Shi H.Y., Zhang W., Liang R., et al. Blocking tumor growth, invasion and metastasis by maspin in a synergic breast cancer model. *Cancer Res* 2001;61:6945-6951

12. Li Q., Ming Z. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. *J Biol Chem* 2010;285(42):32360-32369
13. Maas N., Hojo T., Rosel F., Ikeda T., Jonat W., Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biomed* 2001; 34:303-307
14. Machtens S., Serth J., Bokemeyer C., et al. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer :correlation with clinical features. *Int J Cancer* 2001;95:337-342
15. Xia W., Lau Y.K., Hu M.C., et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000;19:2398-2403
16. Maas N., Hojo T., Ueding M., et al. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. *Clin Cancer Res* 2001;7:812-817
17. Terashima M., Maesawa C., Oyama K., et al. Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1130-1136
18. Umekita Y., Ohi Y., Sagara Y., et al. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* 2002;100:452-455
19. Goulet B., Kennette W., Ablack A., et al. Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. *Lab Invest* 2011;91:1181-1187
20. Sood A.K., Fletcher M.S., Gruman L.M., et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin cancer Res* 2002;8:2924-2932
21. Secord A.A., Darcy K.M., Hutson A., et al. The regulation of MASPIN expression in epithelial ovarian cancer: association with p53 status, and MASPIN promoter

- methylation: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2011;123:314-319
22. Murai S., Maesawa C., Masuda T., Sugiyama T. Aberrant maspin expression in human endometrial cancer. *Cancer Sci* 2006;97(9):883-888
 23. Li H.W.R., Leung S.W., Chan C.S.S., Yu M.M., Wong Y.F. Expression of maspin in endometrioid adenocarcinoma of endometrium. *Oncol Rep* 2007;17:393-398
 24. Denny L., Hacker N.F., Gori J., et al. (FIGO Committee on Gynecologic Oncology) Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecologic Cancers 2000;70:207-312
 25. Abraham S., Zhang W., Greenberg N., Zhang M. Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells. *J Urol.* 2003;169(3):1157-1161
 26. Endsley M.P., Hu Y., Deng Y., et al. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and beta1 integrin that facilitates cell adhesion. *J Biol Chem.* 2011 Jul 15;286(28):24599-24607
 27. Tsuji T., Umekita Y., Ohi Y., et al. Maspin expression is up-regulated during the progression of endometrioidendometrial carcinoma. *Histopathology* 2007;51(6):871-874
 28. Torres A., Torres K., Paszkowski T., et al. Highly increased maspin expression corresponds with up-regulation of miR-21 in endometrial cancer: a preliminary report. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Jan;21(1):8-14
 29. Di Cristofano A., Ellenson L.H., Endometrial Carcinoma. *Annu Rev Pathos Mech Dis* 2007;2:57-85
 30. Kendall B.S., Ronnett B.M., Isacson C., et al. Reproducibility of the diagnosis of endometrial hyperplasia, atypical hyperplasia, and well-differentiated carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1998 Aug;22(8):1012-1019

31. Marioni G, Blandamura S, Lionello M, et al. Nuclear MASPIN expression relates to a better prognosis in elderly patients with laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2011;131(11):1220-1225.
32. Ryan K.M., Phillips A.C., Vousden K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(3):332-7
33. Seeger A., Kölbl H., Petry I.B., et al. p53 is correlated with low BMI negative progesterone receptor status and recurring disease in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2011 Dec 28(in press)
34. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol.* 1995;26(11):1268-1274
35. Lee EJ, Kim TJ, Kim DS, Choi CH, Lee JW, Lee JH, Bae DS, Kim BG. p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review. *Gynecol Oncol.* 2010 Mar;116(3):533-538
36. Alvarez Secord A., Darcy K.M., Hutson A., et al.. The regulation of MASPIN expression in epithelial ovarian cancer: association with p53 status, and MASPIN promoter methylation: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2011 Nov;123(2):314-319
37. Suthipintawong C., Wejaranayang C., Vipupinyo C. Prognostic significance of ER, PR, Ki67, c-erbB-2, and p53 in endometrial carcinoma. *J Med Assoc Thai.* 2008 Dec;91(12):1779-1784
38. Zhu C., Luo J., Shi H., Xie X., Ding Z. Expression of tubulin, p53, ki67, receptors for estrogen, and progesterone in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2009;30(5):514-517

39. Ferrandina G., Ranelletti F.O., Gallotta V., et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), receptors for estrogen (ER) and progesterone (PR), p53, ki67, and neu protein in endometrial cancer, *Gynecol Oncol*, 2005, 98(3):383–389
40. Vered M., Allon I., Dayan D.: Maspin, p53, p63 and Ki67 in epithelial lesion of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:314-320