

Dall'esofagite all'esofago di Barrett: aspetti anatomo-patologici

■ Vengono esaminate le caratteristiche istologiche che permettono la diagnosi di esofago di Barrett, displasia di grado lieve o severo, adenocarcinoma. Particolare riferimento viene posto nell'individuazione di metodiche più recenti che aiutino nella identificazione della displasia e soprattutto nella sua differenziazione in displasia di basso e alto grado.

■ The authors examine the histological characteristics for the diagnosis of Barrett's esophagus, low or high grade dysplasia, adenocarcinoma. Particular attention was done on the identification of more actual methods that help in the identification of low or high grade dysplasia.

■ Parole chiave: esofago di Barrett, dispasia

■ Key words: *Barrett's esophagus, dysplasia*

Introduzione

L'esofago di Barrett (BE) è una condizione patologica acquisita, in cui l'epitelio squamoso stratificato che normalmente riveste l'esofago distale è sostituito da un epitelio colonnare metaplastico di tipo gastrico o intestinale (1). La condizione rappresenta una peculiare forma di difesa in presenza di un severo, prolungato reflusso gastro-esofageo.

L'esofago di Barrett è una condizione premaligna perchè predispone allo sviluppo di adenocarcinoma attraverso una sequenza multistep di eventi che hanno avuto inizio con il reflusso cronico gastroesofageo e successivamente hanno portato alla metaplasia, displasia ed infine adenocarcinoma (1).

■ Vincenzo Villanacci
■ Elisa Rossi
■ Domenico Della Casa
■ Renzo Cestari

— *Cattedra di Anatomia ed Istologia Patologica
Università degli Studi di Brescia
Il Servizio di Anatomia Patologica
Spedali Civili di Brescia*

— *Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università degli Studi di Brescia
Centro di Endoscopia Digestiva
Spedali Civili di Brescia*

Negli ultimi anni l'incidenza di questa neoplasia in pazienti con esofago di Barrett è in aumento rispetto ad altri tumori ed è stato stimato che i pazienti che svilupperanno neoplasia, per anno, passerà da 1 su 46 a 1 su 441, un rischio 30-40 volte più alto rispetto a ciò che avviene nella popolazione normale (1).

Una regolare sorveglianza endoscopica e multiple biopsie esofagee vengono raccomandate nel tentativo di individuare la displasia, il vero precursore dello sviluppo del carcinoma.

Tuttavia, esiste un considerevole grado di soggettività e di sostanziale disaccordo nella diagnosi e nell'attribuzione del "grading" di displasia, che viene identificato soprattutto in base all'esperienza del patologo.

Poiché la displasia è il vero punto chiave nella sequenza esofago di Barrett-carcinoma, il fine di questa trattazione è quello di esaminare l'esatta definizione di displasia, le precise caratteristiche istologiche ed i nuovi metodi per la sua determinazione.

La displasia

Prima di tutto valutiamo fondamentale considerare la nuova definizione di esofago di Barrett proposta dall'American College of Gastroenterology nel 2001: "Un cambiamento nell'epitelio esofageo di qualsiasi lunghezza che può essere riconosciuto endoscopicamente e in cui l'esame istologico conferma la presenza di metaplasia intestinale".

Tale definizione rende il patologo "dipendente" dal clinico nel senso che il clinico deve informarlo del potenziale esofago di Barrett e di conseguenza, "presumendo un adeguato campionamento bioptico esofageo, attualmente è ragionevole per il patologo adeguarsi al detto: no goblets, no Barrett's" (2). In base a queste considerazioni, due sono i punti cruciali:

- per l'endoscopista la precisa localizzazione delle biopsie
- per il patologo la presenza di metaplasia intestinale

Nell'identificazione della metaplasia, completa e/o incompleta, particolarmente utile risulta l'impiego di Alcian-PAS e di H.I.D (High Iron Diamine); mentre non è risultata così utile la colorazione immunohistochimica per le citokeratine 7 e 20 (la presenza di metaplasia intestinale nel cardias è un problema che non verrà trattato in questo report).

L'identificazione della displasia

Il secondo problema è l'identificazione della displasia; per definizione "Displasia è un processo neoplastico che resta confinato nell'ambito ghiandolare senza superamento della membrana basale, non è un processo reattivo, difficilmente può regredire spontaneamente". Più recentemente è stata formulata una seconda definizione: "Una costellazione di anomalie istologiche espressione di un danno del DNA che predispone alla malignità" (3,4).

La displasia nell'esofago di Barrett viene classificata come displasia di basso o alto grado, basandosi sul tipo di anomalie presenti nel campione in esame ed utilizzando gli stessi criteri suggeriti da *Riddel e collaboratori* nella valutazione della displasia sorta nella malattia infiammatoria cronica intestinale (5).

Le possibilità includono le seguenti categorie:

- negativo per displasia
- positivo per displasia, basso grado o alto grado
- indefinito per displasia

Nella displasia di basso grado (LGD) l'architettura delle cripte tende ad essere conservata con solo una minima distorsione ed i nuclei morfologicamente atipici sono limitati alla parte basale delle cripte.

fig. 1: low grade displasia in esofago di Barrett (HEX10)

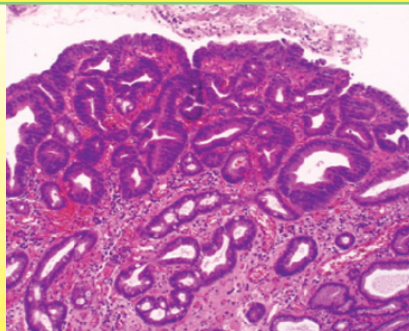
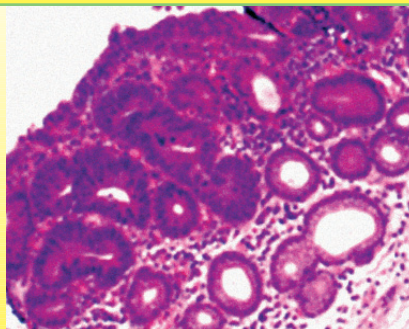


fig. 2: particolare della figura precedente a maggiore ingrandimento (HEX20)



I nuclei tendono a mostrare ipercromasia, sovrapposizione dei confini nucleari con affollamento nucleare e contorni irregolari. Si possono osservare anche cellule goblet distrofiche (**figure 1 e 2**).

La displasia di alto grado (HGD) mostra maggiori atipie citologiche e maggiore complessità architetturale. Citologicamente le cellule mostrano pleiomorfismo

fig. 3: high grade displasia (HEX10)

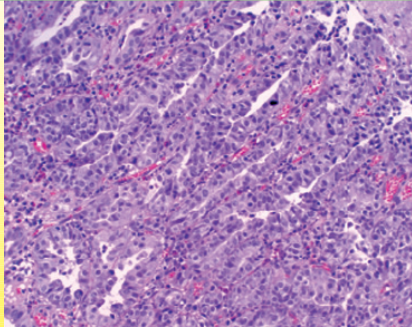
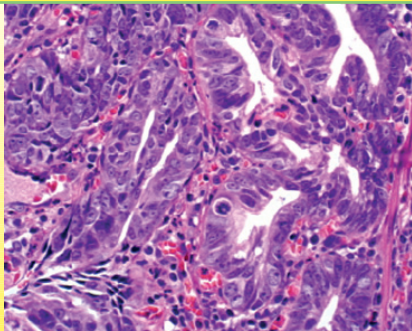


fig. 4: high grade displasia (HEX20)



nucleare ed ipercromatismo; si osserva spesso una stratificazione nucleare verso la superficie luminale della cripta (**figure 3 e 4**).

I maggiori problemi nell'identificazione della displasia sono:

- errori di campionamento
- interpretazione diagnostica

in particolare nell'identificazione di "reattivo vs displastico", "displasia a basso grado vs displasia ad alto grado", "displasia ad alto grado vs adenocarcinoma". Per quanto concerne il primo problema, la displasia può essere irregolarmente distribuita nell'esofago di Barrett; usando la regola di 4 biopsie per centimetro di esofago ci si attende una più alta frequenza di identificazione dei foci displastici; la necessità di una precisa e diffusa mappatura è stata enfatizzata dal fatto che molti esempi di HGD non sono associati a lesioni grossola-

namente riconoscibili. Il secondo problema è più complesso ed è strettamente correlato all'esperienza del patologo ed alla qualità del materiale esaminato.

Reid et al. (6) trovarono questa variazione particolarmente evidente nella differenziazione tra negativo per displasia vs LGD o indefinito per displasia (56-61% di accordo); più recentemente *Montgomery et al.* (7) confermano un alto grado di variazione tra i patologi con particolare interesse in questo campo nella identificazione di queste categorie.

In ogni caso la HGD, frequentemente osservata nella mucosa adiacente all'adenocarcinoma invasivo dell'esofago, rappresenta il più immediato precursore della neoplasia.

Infatti in circa il 30-40% degli esofagi resecati per HGD è stato trovato un concomitante adenocarcinoma; nello studio prospettico di *Weston* di pazienti con unifocale HGD, 8 su 15 pazienti (53%) hanno progredito a carcinoma invasivo o a HGD multifocale. Gli autori hanno concluso che la HGD presenta un elevato rischio di progredire a HGD multifocale o carcinoma invasivo; ci sono molte altre esperienze in questo senso e la gestione di pazienti con esofago di Barrett correlato a displasia rimane comunque controversa. Nella nostra istituzione consideriamo la possibilità di effettuare una esofagectomia se viene confermata una diagnosi di HGD; la possibilità di una mucosectomia con una procedura di "suck & cut" è attraente ma, considerando l'espressione multifocale di HGD e la difficoltà di una completa resezione (che comprenda i margini), è raccomandabile solo in alcuni casi particolari.

Molto meno si sa sulla storia naturale della LGD ed in particolare in questo campo l'elevato grado di variabilità tra gli osservatori sembra essere uno dei maggiori danni nella determinazione del significato clinico di questa diagnosi; esplicita in questo senso è l'esperienza di *Skacel et al.* (9) in cui la diagnosi di LGD in 25 pazienti è stata riconsiderata da tre esperti patologi.

Interessante è stato osservare che quando almeno due dei patologi erano d'accordo sulla diagnosi, si presentava una significativa associazione con la progressione della malattia, mentre non si constatava la progressione della lesione quando sussisteva un disaccordo fra i patologi.

Questo studio suggerisce che una diagnosi consensuale di LGD tra i patologi specializzati nel tratto gastrointestinale è associata ad un incremento del rischio di progressione da LGD a HGD o carcinoma invasivo.

Alterazioni della fisiologia cellulare nel BE

Strettamente associato al percorso dei cambiamenti morfologici c'è un altro importante campo di studio e di diagnosi, rappresentato dagli eventi molecolari coinvolti nella progressione da BE a adenocarcinoma. Recentemente *Hanahan e Weinberg* (10) hanno proposto un interessante modello di cancerogenesi che coinvolge cambiamenti a livello del DNA che si verificano in 6 steps essenziali nell'ambito della fisiologia della cellula. In accordo con questa proposta le cellule del tumore devono acquisire l'abilità a:

- provvedere ai propri segnali di crescita
- ignorare i segnali che inibiscono la crescita
- evitare l'apoptosi
- replicarsi senza limiti
- generare angiogenesi
- metastatizzare

Nel primo step, "autosufficienza di crescita", le alterazioni nell'espressione dei fattori di crescita e dei loro recettori sono state dimostrate nella metaplasia intestinale displasica specializzata e nell'adenocarcinoma insorto da BE.

Le anomalie nella famiglia ERb (Estrogen Receptor beta) dei recettori tirosin chinasi per i fattori di crescita e nei loro ligandi, quali EGF (Epidermal Growth Factor) e TGF-alpha (Transforming Growth Factor-alpha), sono implicate nella progressione tumorale nell'ambito del BE.

Nel secondo step, "capacità ad ignorare i segnali d'inibizione della crescita", si sono riscontrate anomalie nei geni p16 e p53 che normalmente bloccano la fosforilazione delle proteine del retinoblastoma (Rb). Mutazioni, perdita di eterozigosi (LOH - Loss Of Heterozygosity) o ipermetilazione del gene per la p16 sono state osservate in più dell'80% dei casi di BE ed in particolare è stata trovata una correlazione tra tali alterazioni ed il grado di displasia (11). Alterazioni nel gene oncosoppressore APC sono state descritte nell'83-92% della HGD ed adenocarcinoma da BE, e solo nel 40-50% dei casi di metaplasia intestinale (12). Nella "capacità di evitare l'apoptosi" le alterazioni che si possono riscontrare consistono in LOH e mutazioni del gene p53 (per un 52-93% nell'adenocarcinoma ed un 1-5% delle cellule metaplastiche del BE (13)), immunoreattività per FasL (trovata in 13 esofagi operati per adenocarcinoma (14)) ed iperespressione della COX-2, che riduce il tasso di apoptosi (trovata in adenocarcinomi esofagei e in BE (15)).

Il "potenziale replicativo senza limiti", ruolo d'estrema importanza in questo campo, è determinato da un'aumentata espressione della telomerasi, che presenta un basso livello d'espressione nella metaplasia intestinale del BE per aumentare progressivamente nella displasia e nell'adenocarcinoma (16).

"Generare angiogenesi" è essenziale per lo sviluppo, la progressione e la metastasi dei tumori maligni. L'espressione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nell'endotelio e nelle cellule epiteliali si è riscontrata nell'adenocarcinoma del BE nelle aree di displasia (17); simili risultati si sono trovati per VEGF-A, VEGF-C e recettori per VEGF.

Nella "invasione del tessuto" e nella "metastasi" si è dimostrata una relazione inversa tra l'espressione delle E-caderine e la progressione neoplastica nel BE (19).

Infine il contenuto in DNA, misurato mediante citofluorimetria, può essere un utile metodo nello studio della displasia nell'ambito della sequenza BE-adenocarcinoma; l'aneuploidia è stata riscontrata in più del 90% di HGD e adenocarcinoma da BE (20).

In conclusione numerose alterazioni genetiche riflettono la progressione neoplastica nel BE ma non esiste un singolo marker molecolare in grado di valutare adeguatamente la progressione neoplastica. Dati molecolari capaci di indirizzare e correggere la diagnosi sarebbero particolarmente utili nell'ambito della displasia per cui ancora oggi, parafrasando le parole di *DeMeester* (21) "un'accurata interpretazione della displasia richiede un esperto patologo".

Alterazioni cromosomiche nel BE

Proprio a causa della sostanziale soggettività nell'interpretazione della displasia, soprattutto nella distinzione fra LGD e HGD, molti autori si sono concentrati nel suo studio applicando metodiche di biologia fra cui la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Alcuni lavori suggerivano che nel passaggio BE-displasia-adenocarcinoma si riscontravano alterazioni a carico di numerosi cromosomi; più frequentemente si sono osservate iperdiploidie dei cromosomi 4 e 8 (22) ed aneusomie cromosomiche di numerosi altri cromosomi tra cui 5, 8, 9, 12, 17, 18 ed Y (23).

Per questo motivo nel nostro gruppo abbiamo scelto quei cromosomi che sembravano alterati con maggior incidenza ed abbiamo focalizzato l'attenzione sui cromosomi 4, 8, 17, 18 ed Y. Ciò che è emerso dal nostro studio condotto su mucosectomie fissate ed incluse in paraffina è stato che durante la progressione BE, LGD, HGD e adenocarcinoma si verificava un aumento delle aneusomie cromosomiche soprattutto a

carico dei cromosomi 4 e 17, mentre poco significative sembravano le alterazioni a carico dei cromosomi 8 e 18. Se i risultati ottenuti erano soddisfacenti per le differenze evidenziate fra BE (assenza di aneusomie cromosomiche) e adenocarcinoma (elevata presenza di aneusomie cromosomiche) sfortunatamente con questo tipo di indagine non è stato possibile definire con certezza le differenze tra LGD e HGD.

Di particolare interesse è stato lo studio del cromosoma Y: in tutti i casi studiati si è osservata normale presenza del cromosoma Y nel BE e nella LGD, mentre una completa assenza del cromosoma Y nella HGD e nell'adenocarcinoma. Se questi dati preliminari fossero confermati su più ampia casistica potremmo suggerire la validazione della "loss of Y chromosome" come marker per la HGD e l'adenocarcinoma, risolvendo i casi di dubbia interpretazione. Sfortunatamente il marker sarebbe applicabile solo alle patologie di BE nell'uomo (che comunque è più frequentemente colpito rispetto alla donna).

Corrispondenza

Vincenzo Villanacci
Il Servizio di Anatomia e Istologia Patologica
Spedali Civili di Brescia
P.zza Spedali Civili 1- 25123 Brescia
Tel. +39 030 3995479/830
Fax +39 030 3995053
e-mail: villanacci@spedalicivili.brescia.it

Bibliografia

- Sharma P, Sampliner RE. **Barrett's esophagus and esophageal carcinoma**. Blackwell Science Inc. 2001.
- Batts KP. Barrett esophagus-more steps forward. *Human Pathology*, 2001;32,4:pp.357-359.
- Spechler SJ. **Barrett's esophagus**. *New England Journal of Medicine* 2002;346:836-842.
- Souza RF, Morales CP, Spechler SJ. Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's esophagus. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2001;15:1087-100.
- Riddel RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical implications. *Human Pathology* 1983;14:931-968.
- Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, Lewin K, Weinstein WM, Antonioli DA, Goldman H. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Human Pathology* 1988;19:166-178.
- Montgomery E, Bronner MP, Godblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Toledano AU, Shyr Y, Washington K. **Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus: a reaffirmation**. *Human Pathology* 2001;32:368-378.
- Weston AP, Sharma P, Topalovski M, Richards R, Cherian R, Dixon A. Long-term follow-up of Barrett's high-grade dysplasia. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000;95:1888-1893.
- Skacel M, Petras RE, Gramlich TL, Sigel JE, Richter JE, Goldblum JR. The diagnosis of low-grade dysplasia in Barrett's esophagus and its implications for disease progression. *The American Journal of Gastroenterology* 2000;95:3383-3387.
- Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000;100:57-70.
- Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K et al. Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1998;115:1381-1386.
- Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:1805-1811.
- Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Laurent-Puig P, Fekete F, Thomas G. TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994;107:1012-1018.
- Younes M, Lechago J, Ertan A, Finnie D, Younes A. Decreased expression of FAS (CD95/APO1) associated with goblet cell metaplasia in Barrett's esophagus. *Human Pathology* 2000;31:434-438.
- Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Research* 1998;58:2929-2934.
- 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.
- Couvelard A, Paraf F, Gratio V et al. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's esophagus. Correlation with VEGF expression. *Journal of Pathology* 2000;192:14-18.
- Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohtula T, Salminen JT, Koivistoinen A, Siivola P, Ronnholm R, Ramo JO, Bergman M, Salo JA. Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20:2971-2979.
- Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence; correlation with disease progression and dedifferentiation. *American Journal of Pathology* 1998;152:135-144.
- Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. **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;95:1669-1676.
- Ireland AP, Clark GWB, DeMeester TR. Barrett's esophagus: The significance of p53 in Clinical Practice. *Annals of Surgery* 225;1:17-30.
- Doak SH, Jenkins GJS, Parry EM et al. Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus. *Gut* 2003;52:623-628.
- Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ et al. **Molecular evolution of metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus**. *American Journal of Pathology* 1999;154:965-973.