

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXXII

**Settore Concorsuale: 07/H2** Patologia Veterinaria E Ispezione Degli Alimenti Di Origine Animale

**Settore Scientifico Disciplinare: VET/03** - Patologia Generale E Anatomia Patologica Veterinaria

**TECNICHE BIOMOLECOLARI IN SUPPORTO ALL'ESAME  
ISTOPATOLOGICO IN ONCOLOGIA VETERINARIA**

**Presentata da:** Antonella Rigillo

**Coordinatore Dottorato**

**Ill.mo Prof. Arcangelo Gentile**

**Supervisore**

**Ill.mo Prof. Giuliano Bettini**

**Co- Supervisore**

**Dott.ssa Silvia Sabattini**

**Esame finale anno 2020**

## **Abstract**

Within the last two decades, veterinary medicine has strongly increased its attention for animal best care practices and development of more efficient diagnostic and therapeutic strategies. Namely, in veterinary oncology multi-disciplinary approaches were adopted to better characterize small animals tumors, in order to improve prognosis and validate them as naturally occurring models for the human counterpart. In addition to refining the knowledge of biological behavior and histopathological features of neoplasms, cutting-edge biomolecular technologies are gaining ground in both research and everyday diagnostic workup.

The aim of the present study was to investigate the diagnostic utility of three biomolecular technologies in support of histopathological and immunohistochemical examination, in order to evaluate whether they can enhance the potential of the current gold-standard diagnostic procedures. In particular, we investigated:

- (1) The application of PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) for assessing the clonality of hyperplastic/neoplastic splenic lymphoid lesions in dogs. The suitability of this technique was confirmed in doubtful histological cases through a critical interpretation of the results on the basis of the clinical, morphological and immunophenotyping data.
- (2) The agreement between the gold standard immunohistochemistry and the less invasive flow cytometry in the evaluation of proliferative activity (Ki-67 index) of canine nodal lymphomas. We demonstrated an overall good concordance between the techniques, although the possible prognostic role of Ki-67 in canine lymphoma has still to be clarified.
- (3) The genetic and epigenetic modification patterns of feline oral squamous cell carcinoma, in order to provide biomolecular criteria for the early detection of this late-stage diagnosed and fatal tumor, on the basis of recent discoveries in the human counterpart. A preliminary diagnostic algorithm was proposed as a non-invasive test to discriminate between neoplastic and non-neoplastic feline oral lesions.

*“[...]Mi lasci dire! Se la morte, signor mio, fosse come uno di quegli insetti strani, schifosi, che qualcuno inopinatamente ci scopre addosso... Lei passa per via; un altro passante, all'improvviso, lo ferma e, cauto, con due dita protese le dice: – «Scusi, permette? lei, egregio signore, ci ha la morte addosso». E con quelle due dita protese, la piglia e butta via... Sarebbe magnifica! Ma la morte non è come uno di questi insetti schifosi. Tanti che passeggiano disinvolti e alieni, forse ce l'hanno addosso; nessuno la vede; ed essi pensano quieti e tranquilli a ciò che faranno domani e doman l'altro. Ora io, caro signore, ecco... venga qua... qua sotto questo lampione... venga... le faccio vedere una cosa... Guardi, qua, sotto questo baffo... qua, vede che bel tubero violaceo? Sa come si chiama questo? Ah, un nome dolcissimo... più dolce d'una caramella: – Epitelioma, si chiama. Pronunzii, sentirà che dolcezza: epitelioma... La morte, capisce? è passata. M'ha ficcato questo fiore in bocca, e m'ha detto: – «Tientelo, caro: ripasserò fra otto o dieci mesi!». Ora mi dica lei, se con questo fiore in bocca, io me ne posso stare a casa tranquillo e quieto, come quella disgraziata vorrebbe. Le grido: – Ah sì, e vuoi che ti baci? – «Sì, baciami!» – Ma sa che ha fatto? Con uno spillo, l'altra settimana, s'è fatto uno sgraffio qua, sul labbro, e poi m'ha preso la testa e mi voleva baciare... baciare in bocca... Perché dice che vuol morire con me. E' pazza... A casa io non ci sto. Ho bisogno di starmene dietro le vetrine delle botteghe, io, ad ammirare la bravura dei giovani di negozio. [...]*

*Mi ossequi la sua egregia signora e anche le sue figliuole in villeggiatura. Me le immagino vestite di bianco e celeste, in un bel prato verde in ombra...E mi faccia un piacere, domattina, quando arriverà. Mi figuro che il paesello disterà un poco dalla stazione. – All'alba, lei può fare la strada a piedi. – Il primo cespuglietto d'erba su la proda. Ne conti i fili per me. Quanti fili saranno, tanti giorni ancora io vivrò. Ma lo scelga bello grosso, mi raccomando. Buona notte, caro signore”.*

*Pirandello – “L'uomo dal fiore in bocca”*



# Indice dei contenuti

<b>Parte prima. Il test clonalità di linfoide</b> .....	1
Capitolo I. Stato dell'arte.....	2
• Gli obiettivi del test.....	2
• Principi di funzionamento.....	3
• Il test di clonalità linfoide in medicina veterinaria.....	8
• Le fasi di esecuzione del test di clonalità linfoide.....	14
• L'importanza dell'integrazione con dati clinici, morfologici, e di immunofenotipo..	30
• Prospettive future.....	33
Capitolo II. <i>Contributo sperimentale</i> : Noduli splenici linfoidi nel cane: immunofenotipizzazione, attività proliferativa e clonalità. ....	36
<b>Parte seconda. La citofluorimetria a flusso</b> .....	59
Capitolo III. Stato dell'arte.....	59
• La tecnologia citofluorimetrica.....	56
• Preparazione delle cellule.....	66
• La marcatura anticorpale e la scelta dello strumento.....	68
• Analisi di DNA ed RNA.....	73
• Analisi dei dati.....	77
• Applicazioni in campo veterinario.....	80
Capitolo IV. <i>Contributo sperimentale</i> : Concordanza tra immunoistochimica e citofluorimetria a flusso nella valutazione del ki-67 index nel linfoma del cane. ....	97

<b>Parte terza. Analisi delle metilazioni del DNA.....</b>	<b>115</b>
Capitolo V. Stato dell'arte.....	116
• Le basi molecolari della metilazione del DNA.....	117
• Anomalie nella metilazione del DNA nelle neoplasie.....	121
• Tecniche di determinazione del <i>Metiloma Genomico Tumorale</i> .....	124
• Il carcinoma squamocellulare di testa e collo dell'uomo (HNSCC) .....	127
• La cancerizzazione di campo e le alterazioni genomiche nel tumore di testa e collo.....	128
• Fluidi corporei per la rilevazione dei biomarkers circolanti di HNSCC.....	130
• L'analisi delle metilazioni in oncologia veterinaria.....	135
 Capitolo VI. <i>Contributo sperimentale: Analisi delle metilazioni geniche e dello stato mutazionale di p53 per differenziare il carcinoma squamocellulare orale felino dalla mucosa non neoplastica: studio pilota</i> .....	 140
 <b>Bibliografia.....</b>	 <b>162</b>

*Parte I*

**La clonalità linfoide ed il test di PCR per il riarrangiamento  
del recettore antigenico (PARR)**

## Capitolo I

### Il test di clonalità linfoide

#### 1.1 Gli obiettivi del test

Il test di clonalità molecolare mediante PCR per il riarrangiamento del recettore antigenico (*PARR*) è un test specie specifico, che in veterinaria è attualmente disponibile per cane, gatto e cavallo. Tale test valuta la diversità del riarrangiamento genico del recettore antigenico dei linfociti, fornendo un supporto nella differenziazione di una proliferazione linfoide reattiva da una neoplastica (linfoma) nei casi in cui la valutazione microscopica non risulti risolutiva. I test di clonalità molecolare sono particolarmente utilizzati per valutare proliferazioni linfoidi atipiche, miste, o mature in campioni di tessuto di piccole dimensioni con architettura non apprezzabile, strisci cellulari, e campioni di fluidi biologici come ad esempio il liquido cerebrospinale. Inoltre, il test di clonalità può essere utilizzato per la stadiazione dei linfomi o per il monitoraggio della malattia nel tempo o in seguito al trattamento medico (valutazione della malattia minima residua). Tuttavia, questo test non è da considerarsi valido in assoluto, ma come un utile supporto diagnostico che faccia seguito ai reperti clinici, morfologici e di immunohistochimica, e, allo stesso modo, non dovrebbe essere utilizzato come surrogato di quest'ultima per la valutazione del fenotipo della popolazione linfomatosa (van Dongen *et al.*, 2003). Questo test è inoltre da considerarsi superfluo di fronte a quadri istologici franchi di neoplasia linfoide.

## 1.2 Principi di funzionamento

L'immunità acquisita è imperniata sul riconoscimento di specifici antigeni da parte dei linfociti (Cooper and Alder, 2006). Il riconoscimento antigenico è facilitato da due tipi di recettori, il recettore delle cellule B ed il recettore delle cellule T (Fig.1.1). I recettori antigenici sono composti da catene recettoriali, ciascuna delle quali è codificata in un *locus*, ovvero una distinta regione cromosomiale. A differenza degli altri geni, il gene del recettore antigenico non presenta una catena nucleotidica costante. Infatti, in ogni linfocita viene costituito un nuovo gene del recettore antigenico con una sequenza e specificità di ligando uniche attraverso il riarrangiamento di piccoli geni multipli (a cui si fa comunemente riferimento come "segmenti genici") (Tonegawa *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1988).

I geni del recettore antigenico linfocitario sono classificati in sequenze variabili (V), di diversità (D), di giunzione (J), e costanti (C), con un numero multiplo di geni per ogni tipo (Fig.1.2). Durante il riarrangiamento del recettore, un gene per ogni sequenza V, D e J viene unito agli altri attraverso rimozione del DNA interposto, con aggiunta o rimozione di nucleotidi dalla parte terminale dei geni interessati. La regione giunzionale che ne risulta viene definita come *complementary determining region 3* (CDR3). Questa è unica per ogni clone linfocitario ed è la principale determinante della specificità del recettore antigenico. I riarrangiamenti possono avvenire su un cromosoma (riarrangiamento mono-allelico) o su entrambi i cromosomi (riarrangiamento bi-allelico) (Langerak *et al.*, 2012).

Il riarrangiamento dei loci del recettore antigenico dipende dalla *lineage* di un linfocita, e segue una ben definita sequenza di eventi (Fig.1.3) (Raulet *et al.*, 1985). Le cellule della linea T riarrangiano per primo il locus del loro T-cell receptor (TR) delta (TRD), seguito dal locus TR gamma (TRG); un linfocita T assume a questo punto un fenotipo  $\gamma\delta$ , oppure può procedere

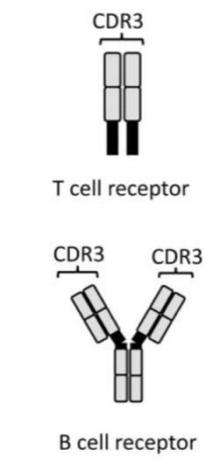
al riarrangiamento dei loci TR beta (TRB) e alfa, assumendo così fenotipo  $\alpha\beta$ . In quest'ultimo caso, il TRD viene eliminato su almeno uno dei cromosomi, mentre il riarrangiamento del TRG viene preservato in entrambi i fenotipi, il che rende questo locus il primo target del test di clonalità per le cellule T.

Le cellule B riarrangiano il locus della catena pesante della loro immunoglobulina (IGH), seguito dal locus della catena leggera kappa (IGK). I linfociti possono così esprimere sia un B-cell receptor con catene kappa leggere, sia procedere al riarrangiamento del locus della catena leggera lambda (IGL). In questo caso, il locus IGK viene eliminato attraverso riarrangiamento del *kappa deleting element* (KDE). Poiché il locus IGH viene riarrangiato nelle cellule B indipendentemente dal coinvolgimento delle catene leggere, questo risulterebbe il target principale per il test di clonalità per le cellule B, ma è soggetto a *ipermutazione somatica* durante lo sviluppo della risposta immunitaria. Questo conduce ad una ridotta sensibilità nei saggi di clonalità che sfruttano IGH. Le specie con una catena lambda dominante (canina, felina ed equina) presentano spesso inattivazione del locus IGK; ciò, come visto, avviene grazie al KDE, che può allo stesso modo essere target per il test, evitando il problema dell'ipermutazione somatica del locus IGH che avviene durante la fase di sviluppo delle cellule B, tramite cui il gene viene silenziato prima dell'incontro con un antigene.

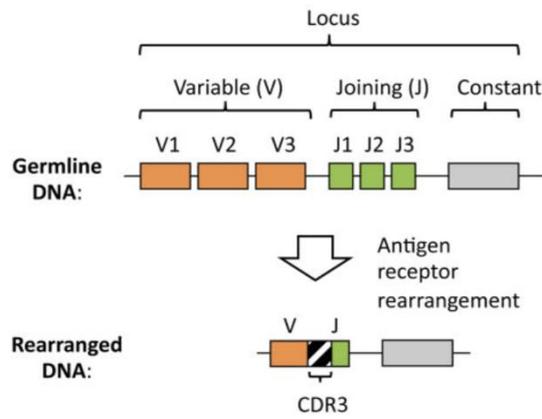
Se i riarrangiamenti del gene del recettore antigenico sono tipicamente associati alla *lineage* linfocitaria, può accadere, in alcune circostanze, che le cellule B riarrangino i loci T, o che le cellule T riarrangino i loci B. Questo fenomeno viene chiamato *riarrangiamento cross-lineage*. Inoltre, anche le cellule mieloidi possono riarrangiare loci B o T (Przybylski *et al.*, 1994; Szczepanski *et al.*, 1999; Szczepanski *et al.*, 1999; Boeckx *et al.*, 2002). Per questo motivo, il

test di clonalità non è raccomandato per la determinazione del fenotipo cellulare, che invece trova maggior accuratezza nei test di immunofenotipizzazione.

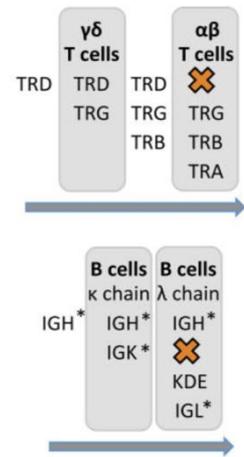
Il test di clonalità sfrutta l'amplificazione del CDR3 mediante PCR per valutare la diversità del riarrangiamento del gene del recettore antigenico presente tra i linfociti lesionali (Fig. 1.4). L'amplificazione del CDR3 viene effettuata con il disegno di *primers forward* per i geni V, e di *primers reverse* per i geni J (van Dongen *et al.*, 2003). L'amplificazione risulta possibile solo nelle cellule che hanno riarrangiato il locus di interesse, altrimenti i geni V e J sarebbero troppo distanti. Nei processi reattivi, i linfociti derivano da molteplici cellule che differiscono nella lunghezza del CDR3, fornendo quindi ampliconi di lunghezze diverse. Nei processi neoplastici, invece, i linfociti derivano da una singola cellula, per cui avranno lunghezza di CDR3 identica, fornendo ampliconi di dimensioni sovrapponibili. La separazione degli ampliconi per dimensione può essere effettuata sia su lastra di gel elettroforesi tradizionale, o tramite elettroforesi capillare, una tecnica a più alta risoluzione rispetto a quella comune. Mediante l'elettroforesi capillare il risultato viene espresso sotto forma di istogrammi, il cui grafico è composto dalla dimensione degli ampliconi sull'asse delle  $x$ , e la relativa fluorescenza (che corrisponde al numero di ampliconi) sull'asse delle  $y$ . Le lesioni reattive formano generalmente una curva con distribuzione normale (Gaussiana), mentre le lesioni neoplastiche disegnano un picco distinto.



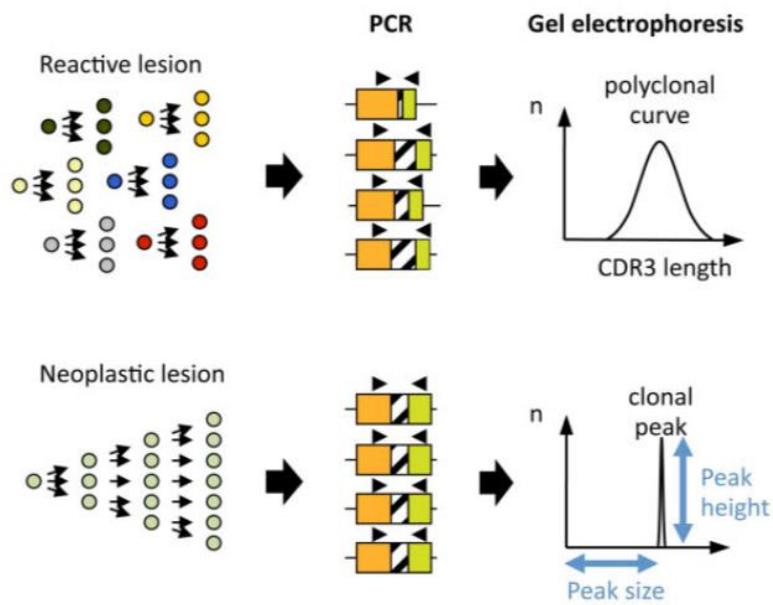
1.1



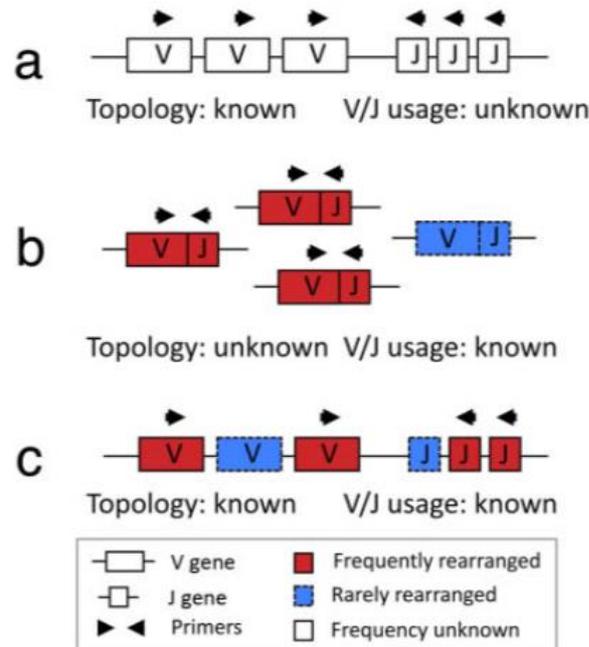
1.2



1.3



1.4



### 1.5

**Figura 1.1.** Antigene recettoriale linfocitario. Il riconoscimento antigenico da parte dei linfociti è facilitato da due tipi di recettore, il B ed il T.

**Figura 1.2.** Ogni catena del recettore antigenico è codificato da un locus, che consiste in geni variabili (V), di giunzione (J), e geni costanti (i geni di diversità D sono stati omessi per maggiore chiarezza). Durante il riarrangiamento del gene recettore antigenico, un gene V ed uno J vengono uniti ed un numero random di nucleotidi vengono aggiunti o eliminati dalla fine dei geni V e J. L'unione finale viene definita complementary determining region 3 (CDR3), e codifica per il sito di legame dell'antigene, determinando la specificità del linfocita.

**Figura 1.3.** Il riarrangiamento dei loci del recettore antigenico segue una sequenza specifica. Cellule T: TRD (T cell receptor delta) → TRG (gamma) → TRB (beta) → TRA (alfa); il riarrangiamento del TRA elimina TRD, ma TRG viene mantenuto nelle cellule  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ . Cellule B: IGH (catena pesante dell'immunoglobulina) → IGK (catena leggera kappa) → IGL (catena leggera lambda). IGK può essere eliminato dal riarrangiamento del kappa deleting element (KDE). \* Loci suscettibili alla mutazione ipersomatica.

**Figura 1.4.** Principio del test di clonalità linfoide. Nei processi reattivi, i linfociti derivano da precursori multipli che possono differire nella lunghezza del CDR3, dando così ampliconi di dimensioni variabili ed una curva Gaussiana all'elettroforesi gel. Nei processi neoplastici, i linfociti derivano da un singolo precursore che quindi ha lunghezze identiche del CDR3, dando ampliconi di dimensioni identiche ed un picco all'elettroforesi gel.

**Figura 1.5.** Strategie per identificare tutti i geni riarrangiati di un locus. (a) Ricerca tramite profilo genomico della sequenza nucleotidica di tutti i geni e della loro topologia, senza conoscere il V/J usage, per cui il test deve ricoprire tutti i geni V e J identificati. (b) Valutazione del repertorio di espressione tramite sequenziamento ad alte prestazioni conoscendo il V/J usage, che consente di limitare il primer design ai geni che riarrangiano con una frequenza significativa. Tuttavia, la mancata conoscenza della topologia del locus complica l'interpretazione dei risultati. (c) Idealmente, entrambe le strategie sono combinate a definire la topologia del locus e il V/J usage.

Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Vet Pathol. 2016; 53:711-725.

### 1.3 Il test di clonalità linfoide in medicina veterinaria

Quando si programma un test di clonalità è necessaria l'identificazione di tutti i possibili riarrangiamenti dei geni V e J per ottenere una sensibilità ottimale. L'amplificazione di una sequenza nucleotidica con PCR si basa sul corretto *annealing* di un primer forward ed uno reverse ad un *template*. Se un gene non viene coperto da nessuno dei primer del test, ma è coinvolto nel processo neoplastico, il test fornirà un risultato falso negativo. Per identificare tutti i geni V e J riarrangiati di un locus vengono utilizzate due strategie (Fig. 1.5): i geni possono essere ricercati nel sequenziamento dell'intero genoma a livello di DNA (mediante GeneScanning), preferibilmente tramite profilo genomico di alta qualità. Questo approccio consente, inoltre, di identificare la localizzazione fisica del gene su un cromosoma (*topologia*), ma non la frequenza con cui il gene venga riarrangiato (*V/J usage*). Il secondo metodo prevede l'identificazione del gene mediante sequenziamento ad alte prestazioni del repertorio di espressione del gene, ovvero a livello di mRNA; questo approccio identifica il *V/J usage* ma non la topologia del locus. La conoscenza della topologia del locus assicura che tutti i geni vengano coperti dai primers, ed è necessaria per la corretta interpretazione dei risultati del test. La conoscenza del *V/J usage* consente di limitare il disegno dei primers a quei geni che hanno una elevata frequenza di riarrangiamento. Questo riduce la complessità del mix di primers ed aumenta le performance del test. Per una progettazione ottimale e per una corretta interpretazione del test di clonalità è quindi cruciale la conoscenza sia del *V/J usage* che della topologia del locus.

Quando i test di clonalità tramite PCR sono stati introdotti per cane e gatto, l'intero profilo genomico di queste due specie non era ancora noto, ed il sequenziamento ad alte prestazioni non era disponibile (Vernau *et al.*, 1999; Burnett *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005; Werner *et*

*al.*, 2005; Valli *et al.*, 2006). Per ottenere la sequenza del gene del recettore antigenico per il disegno dei primer venivano quindi clonati e sequenziati DNA complementari (cDNAs); per via della laboriosa natura di questa metodologia poteva, però, essere analizzato soltanto un piccolo numero di cloni. Di conseguenza, i dati dei sequenziamenti erano limitati, e venivano identificati soltanto i geni più frequentemente riarrangiati.

Il miglioramento del test di clonalità si è concentrato, di conseguenza, sull'identificazione di un maggior numero di geni per consentire una maggiore copertura da parte dei primers. Weiss *et al.* (Weiss *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2011). e Henrich *et al.* (Heinrich *et al.*, 2009). svilupparono il test di clonalità linfoide rispettivamente per i loci TRG e IGH del gatto. I loro test si basavano sulle sequenze estratte dall'archivio TRACE (NCBI, National Center for Biotechnology Information) e sul sequenziamento dei cloni di cDNA. Mochizuki e colleghi (Mochizuki *et al.*, 2011; Mochizuki *et al.*, 2011) descrissero il test di clonalità felino per l'utilizzo dell'elettroforesi capillare basandosi su dati di sequenziamento di cDNA aggiuntivi. Nel cane, il test di clonalità è stato sviluppato o modificato da Yagihara *et al.* (Yagihara *et al.*, 2007), Kisseberth *et al.* (Kisseberth *et al.*, 2007), e Gentilini *et al.* (Gentili *et al.*, 2009). Tuttavia, tutti questi test si basavano su un basso numero di cloni cDNA e non tenevano in considerazione la topologia del locus. Di conseguenza, erano possibili risultati falsi negativi per l'inadeguata copertura dei primers.

Il rilascio dell'intero profilo genomico di varie specie nel decennio scorso ha consentito la definizione dei loci per il recettore antigenico e di conseguenza un disegno del test di clonalità che coprisse tutti i geni del locus. Nel 2009, la descrizione completa del locus da parte di Massari e colleghi (Massari *et al.* 2009) ha mostrato che il locus TRG canino è composto da 7 clusters V-J-C (definiti "cassette geniche"), rispetto all'unica presente nell'uomo. Utilizzando

un test multiplex che coprisse tutti i potenziali geni riarrangiati, Keller e Moore (Keller e Moore, 2012; Keller e Moore, 2012). hanno mostrato che le cellule T del cane riarrangiano frequentemente molteplici cassette, risultando così in più di un riarrangiamento per cromosoma, o più di due riarrangiamenti per linfocita (Fig. 1.6). Questa scoperta fu innovativa, poiché più di 2 riarrangiamenti clonali per campione erano stati, fino ad allora, attribuiti a più di una espansione clonale singola (*oligoclonalità*). Inoltre, ciò enfatizza l'importanza della conoscenza della topologia del locus quando si sviluppa e si interpreta un test di clonalità.

Sebbene la copertura di tutti i geni riarrangiati limiti significativamente i risultati falsi negativi, il test multiplex TRG resta subottimale. Poiché il test non tiene in considerazione il *V/J usage* su larga scala, contiene dei primers per geni che riarrangiano in maniera incostante. Il mix di primers è quindi più complesso del necessario, portando così ad una amplificazione meno consistente. L'amplificazione di tutti i possibili riarrangiamenti, infatti, incrementa il "rumore" di sottofondo di tutti i linfociti non neoplastici. Ciò rende il test più suscettibile ai risultati falsi negativi in quelle lesioni con un significativo background policlonale; sarebbero quindi necessarie ulteriori modifiche del set di primers basato sui dati di sequenziamento ad alte prestazioni per stabilire il *V/J usage* su larga scala.

Concludendo, gli attuali test di clonalità disponibili in medicina veterinaria si basano su dati di sequenza limitati, e vi è una grande mancanza di considerazione della topologia del locus, che predispone a risultati falsi negativi. La disponibilità dei profili genomici per poter delucidare la topologia del locus sta man mano aumentando negli animali da compagnia, e i sequenziamenti ad alte prestazioni sono diventati sufficientemente abordabili per poter essere utilizzati nella determinazione del *V/J usage*.

Recentemente sono stati sviluppati e validati, grazie soprattutto alla maggiore disponibilità della tecnologia GeneScanning, test di clonalità associati a tecniche maggiormente sensibili (come l'analisi *in silico*) e con diversi e innovativi set di primer mirati ai geni IGH e TRG per incrementare la sensibilità e la specificità del test, sia nel cane che nel gatto (Goto-Koshino *et al.*, 2015; Waugh *et al.*, 2016; Hammer *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2019); oltre al sequenziamento e all'elettroforesi capillare, altre tecniche più accessibili quali la Melting Curve Analysis (MCA) e la melting curve analysis ad alta risoluzione (HRM) associate a real-time PCR hanno prodotto, in alcuni casi, un miglioramento della sensibilità analitica della PARR (Langner *et al.*, 2014; Schöpfer *et al.*, 2017; Henrich *et al.*, 2018).

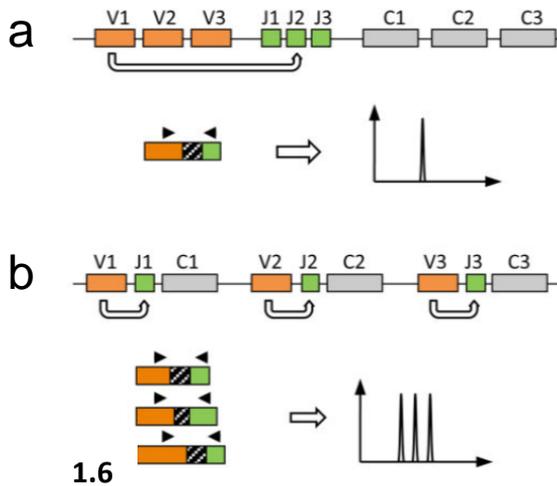
Un recente studio ha infine descritto la performance in termini di accuratezza, sensibilità e specificità del test PARR nella diagnosi di linfoma canino a partire da diverse matrici, provando a definire un valore soglia di riferimento per un protocollo PARR (Ehrt *et al.*, 2019)(Tabella 1.1).

In medicina veterinaria, l'impiego della PARR per la diagnosi di linfoma ha trovato interesse soprattutto in quei casi in cui i quadri istopatologici e citologici presentassero molte sovrapposizioni morfologiche tra quadri reattivi o iperplastici e neoplastici, rappresentando vere e proprie sfide diagnostiche nella pratica quotidiana. Tra questi, spiccano come esempi la diagnosi di linfoma intestinale rispetto a quella di enteropatia cronica a partire da campioni biotici endoscopici di cane e di gatto, dove il sussidio della PARR può trovare validità diagnostica (Kaneko *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2015; Hiyoshi *et al.*, 2015; Gress *et al.*, 2016; Sabbatini *et al.*, 2016; Ohmura *et al.*, 2017; Marsilio *et al.*, 2019), e quella di timoma rispetto a linfoma mediastinico in cui è stata identificata una sensibilità discriminante significativamente elevata dell'esame biomolecolare (Vassieres *et al.*, 2018). È stata inoltre indagata la sensibilità

della tecnica nel plasmocitoma cutaneo canino, in quanto neoplasia piuttosto diffusa nel cane e di origine linfoide B in cui è stata riscontrata una sensibilità minore di quella del DLBCL nell'identificazione di riarrangiamento a carico di IGH (Takanosu *et al.*, 2018).

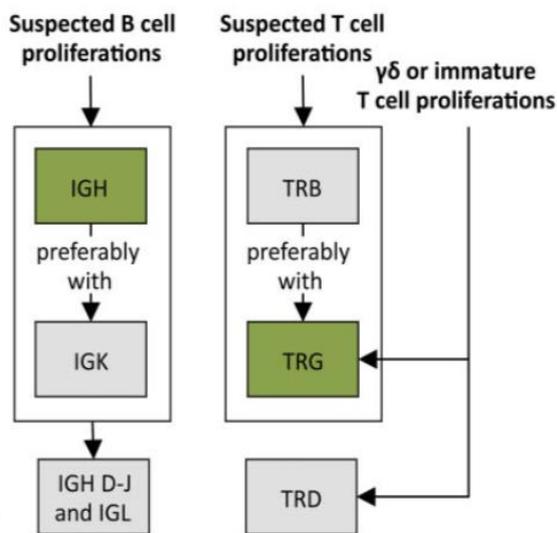
**Tabella 1.1.** Valori di sensibilità, specificità ed accuratezza nella diagnosi di linfoma di cane in diverse matrici di un protocollo PARR basato sul primer set di Waugh *et al.*, 2016, CON basso DNA input, touchdown PCR (Korbie *et al.*, 2008), e implementando l'analisi del picco elettroforetico mediante utilizzo di BioAnalyzer

Matrice	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
FFPE	92%	92%	92%
Pellets per citofluorimetria	85%	NA	85%
FNA	100%	100%	100%



**Figura 1.6.** Associazione della struttura del locus e numero di possibili riarrangiamenti. Entrambi gli ipotetici loci hanno lo stesso numero totale e tipi di geni. (a) L'arrangiamento in una singola cassetta V-J-C può produrre un solo riarrangiamento per cromosoma. (b) L'arrangiamento in tre cassette V-J-C può produrre fino a 3 riarrangiamenti per cromosoma.

Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. *Vet Pathol.* 2016; 53:711-725.



1.7

**Figura 1.7.** La strategia di selezione del target per la diagnostica di clonalità in medicina umana (adattata da Langerak *et al.*, 2012). Loci multipli vengono indagati contemporaneamente o in maniera sequenziale per compensare le carenze dei test singoli. In medicina veterinaria, questa ridondanza non riesce ad essere ottenuta poiché i test di clonalità per le proliferazioni B e T sono state descritte solamente per i loci (caselle verdi) IGH e TCR rispettivamente. I lavori in corso sono proiettati verso l'identificazione di target di clonalità alternativi (caselle grigie). Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with

#### 1.4 Le fasi di esecuzione del test di clonalità linfoide

Le fasi del test di clonalità si suddividono in una fase di laboratorio, in cui si effettuano la preparazione del campione, la selezione del target, l'amplificazione PCR e l'elettroforesi su gel, ed una fase di interpretazione.

##### ◆ *Preparazione del campione*

Il test di clonalità viene generalmente eseguito sul DNA genomico, poiché questo è più resistente dell'RNA, e può essere ottenuto da matrici di più scarsa qualità come i tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) (Lenze *et al.*, 2012). Altre possibili matrici includono vetrini citologici, campioni congelati e liquidi.

In alcune circostanze può essere indicato selezionare porzioni del campione per l'estrazione del DNA: nei blocchetti multi-tessuto è buona norma l'esclusione di componenti tissutali che contengono elevati numeri di linfociti (ad esempio i linfonodi), che altrimenti potrebbero oscurare il segnale della popolazione linfoide neoplastica. È altrettanto opportuna l'esclusione di componenti tissutali che non contengono linfociti e che sono inclusi nello stesso blocco di paraffina del tessuto oggetto di indagine; grandi quantità di DNA non-linfoide, infatti, possono abbassare la sensibilità del test. L'estrazione selettiva di DNA in un numero sufficiente di sezioni per ottenere una quantità adeguata di DNA aumenta la probabilità di rivelazione della clonalità, ma richiede prima la valutazione microscopica del campione. In alternativa, il campione può essere ottenuto mediante raschiamento da un numero sufficiente di sezioni già montate su vetrino. Il DNA dovrebbe essere estratto dallo stesso vetrino o blocchetto utilizzato per la valutazione microscopica per poter consentire la correlazione tra riscontri morfologici, molecolari e di immunofenotipo.

Per la valutazione della qualità e purezza del DNA estratto viene comunemente utilizzata la spettrofotometria. Questo metodo risulta sufficientemente preciso se la PCR di clonalità mostra risultati consistenti rispetto le piccole variazioni del DNA di input. L'obiettivo è quello di avere almeno 10 ng di DNA per 50 microlitri di reazione.

Le situazioni in cui è presente quantità insufficiente di DNA si verificano in genere con aspirati a bassa cellularità, campioni istopatologici di piccole dimensioni, come ad esempio biopsie con punch, oppure come conseguenza di errori tecnici durante la fase di estrazione di DNA.

L'integrità del DNA, al contrario, non è evidente dall'estratto, e la misurazione e valutazione della purezza richiedono amplificazione di una sequenza di DNA che sia comparabile in termini di dimensione con l'amplicone clonale. Poiché ciò risulterebbe costoso se effettuato su ogni campione, viene spesso omesso nella diagnostica di routine, e viene eseguito solo quando i risultati dell'elettroforesi infondono il sospetto di DNA frammentato. Questa condizione si verifica se l'amplificazione è incospicua nonostante l'elevato numero di linfociti lesionali del relativo immunofenotipo. La compromissione dell'integrità del DNA si riscontra primariamente nei campioni FFPE dopo una prolungata fissazione in formalina (Lenze *et al.*, 2012).

◆ *Selezione del target*

La selezione del target si basa principalmente sulla *lineage* di appartenenza della popolazione neoplastica sospetta (Langerak *et al.*, 2012). In via teorica, ognuno dei 7 loci del recettore antigenico che codificano per le catene recettoriali B e T potrebbe essere valutato per il test di clonalità, e l'indagine di loci multipli consentirebbe di avere le informazioni più esaustive (van Dongen *et al.*, 2003). Tuttavia, in medicina veterinaria, le scelte sono limitate dalla disponibilità del test e dal costo. L'immunofenotipizzazione effettuata prima del test di clonalità risulta essenziale non solo per una selezione appropriata del target, ma anche per una corretta interpretazione dei risultati del test (van Krieken *et al.*, 2007). Per le proliferazioni di cellule della *lineage* B, tutti i test pubblicati hanno come target il locus IGH. I primers forward si allineano con le regioni preservate del gene V (framework regions, FRs); i test per la FR2 e FR3 sono in genere quelli adatti per ogni tipo di campione. I test per la FR1 hanno minor spettro di applicazione, poiché la dimensione maggiore del loro amplicone spesso preclude l'amplificazione da campioni FFPE che potrebbero avere un'integrità del DNA compromessa (Lenze *et al.*, 2012). I test che hanno come target framework differenti vengono generalmente eseguiti contemporaneamente per assicurare ridondanza ai risultati falsi negativi per via delle *ipermutazioni somatiche*, che avvengono solamente nelle cellule B. Per la proliferazione delle cellule T, tutti i test pubblicati hanno come target il locus TRG, poiché il locus è riarrangiato in entrambe le cellule  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  (Joachim *et al.*, 2006); l'assenza di ipermutazioni somatiche nelle cellule T evita la necessità di un set di primer multipli che abbiano come target diversi FRs.

In medicina veterinaria sono anche disponibili saggi multipli che abbiano come target sia i loci IGH e TRG; questi saggi, tuttavia, sono stati sviluppati in diverse istituzioni, utilizzando diversi

dati di sequenza, diverse tecniche PCR e diversi sistemi di elettroforesi. Data la mancanza di studi che comparino le performance dei test, la selezione di uno di questi sulla base dei risultati è ancora difficoltosa. Ciò viene aggravato dalla mancanza di un “gold standard” per la diagnosi di linfoma.

In medicina umana, per compensare alle carenze dei test per IGH e TRG, vengono esaminati loci aggiuntivi (Fig. 1.7); valutando almeno due loci contemporaneamente, in particolare IGH ed IGK per le proliferazioni di cellule B, ed il TRB e TRG per le proliferazioni T (Langerak *et al.*, 2012). È stato dimostrato come la combinazione del risultato di due test indipendenti aumenti in maniera significativa l'accuratezza della diagnosi (van Krieken *et al.*, 2007); tuttavia, in medicina veterinaria non sono stati pubblicati test che abbiano come target loci alternativi.

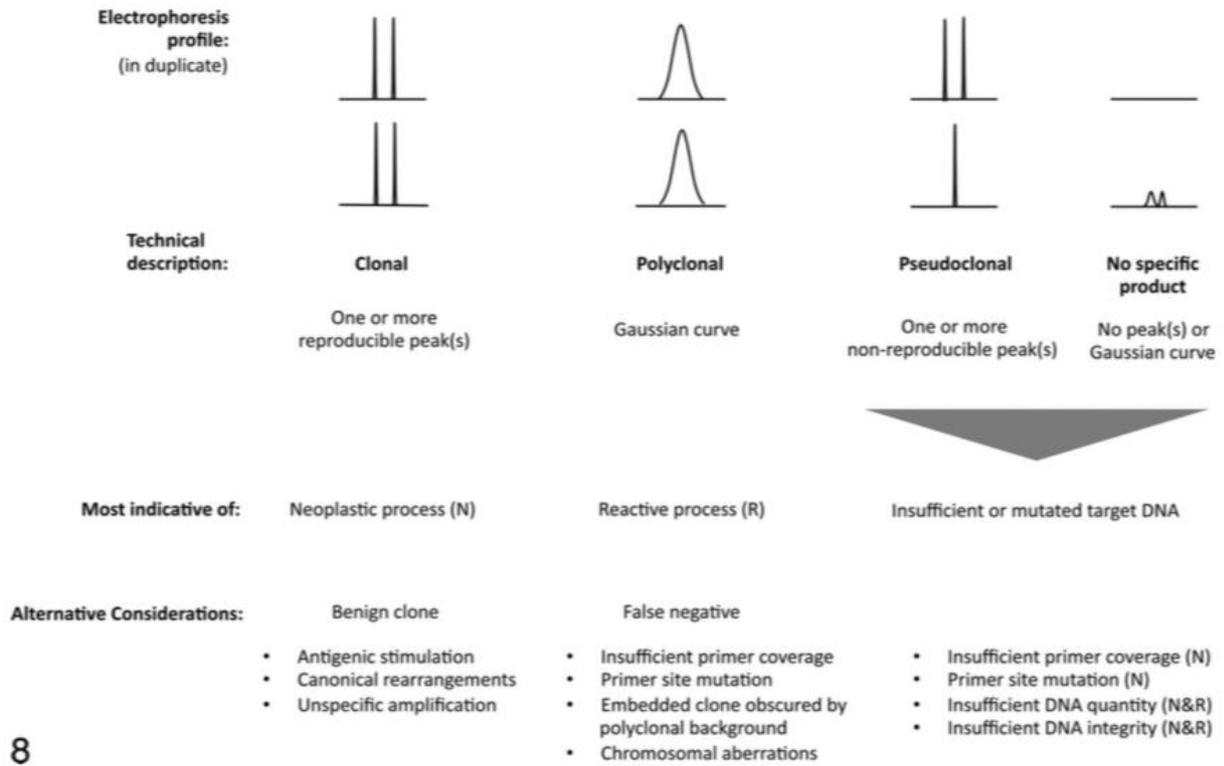
#### ◆ *Amplificazione PCR ed elettroforesi*

Utilizzando la PCR convenzionale, il gene CDR3 è amplificato a livelli che ne consentano la visualizzazione tramite gel elettroforesi. Le reazioni devono essere svolte almeno in doppio per facilitare l'identificazione della *pseudoclonalità* (Langerak *et al.*, 2012). L'elettroforesi capillare sta gradualmente rimpiazzando il tradizionale gel di poliacrilammide per la separazione dimensionale degli ampliconi di PCR, per via della sua più alta risoluzione, trasmissione e facilità di utilizzo (Beaubier *et al.*, 2009). L'elettroforesi ad alta risoluzione risulta particolarmente utile soprattutto in quei casi che hanno come target loci multi-cassette, a causa della frequente presenza di picchi clonali multipli e ravvicinati (Keller and Moore, 2012). La parte finale della fase laboratoristica consiste un profilo elettroforetico che sia espressione delle lunghezze del CDR3 e quindi delle diversità di riarrangiamento del gene del recettore antigenico dei linfociti lesionali (Fig. 1.4).

### ◆ Interpretazione dei risultati

I profili elettroforetici presi singolarmente non sono patognomonici di un processo reattivo o neoplastico, e devono essere interpretati alla luce del contesto clinico, morfologico e immunoistochimico (van Dongen *et al.*, 2003; Langerak *et al.*, 2012); per questo motivo, il test di clonalità non è così definitivo come viene spesso ritratto, ed è ampiamente dipendente dall'esperienza di interpretazione dell'operatore e dalle capacità di integrazione dei risultati (Langerak *et al.*, 2007).

I profili elettroforetici sono classificati in diverse categorie e rappresentati da pattern archetipi (Fig. 1.8) (Langerak *et al.*, 2012). Questi pattern vengono anche definiti come *descrizioni tecniche*. In generale, un profilo elettroforetico *clonale* è considerato indicativo di un processo neoplastico, mentre un profilo elettroforetico *policlonale* è indicativo di un processo reattivo. Tuttavia, risultati policlonali possono verificarsi anche in presenza di neoplasia, così come risultati clonali possono verificarsi in caso di assenza di neoplasia (van Dongen *et al.*, 2003); inoltre, i cloni possono essere presenti anche su un background policlonale, e dare come risultato dei picchi di significato incerto. Le descrizioni tecniche *pseudoclonale* (PSC) o *prodotto non specifico/no specific product* (PNS/NSP) possono essere indicative sia di un processo reattivo che di uno neoplastico, tra le altre cose. Entrambi i profili, tuttavia possono essere informativi se interpretati in maniera appropriata nel loro contesto biologico.



8

**Figura 1.8.** Patterns elettroforetici archetipi, descrizione tecnica, interpretazione ed errori di interpretazione.  
 Fonte: **Keller SM, Vernau W, Moore PF.** Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. *Vet Pathol.* 2016; 53:711-725.

La corretta interpretazione dei pattern elettroforetici richiede che i seguenti punti critici vengano presi in considerazione:

1. Mancata individuazione della clonalità in presenza di neoplasia.

*a. Inadeguata copertura dei primers.* La corretta amplificazione del riarrangiamento clonale dipende dal riconoscimento di entrambi i geni V e J da parte dei primers. Se un clone neoplastico utilizza un clone non individuabile da nessuno dei primer del mix, il test comporterà un risultato falso negativo (Fig. 1.9A). Un risultato falso negativo dovuto ad una copertura inadeguata del primer può essere sospettato se il test di clonalità dovesse essere in conflitto con i dati clinici, morfologici ed immunofenotipici, e fosse noto che il test possiede una copertura di primer incompleta. La prevalenza dei falsi negativi dovuti a questo fenomeno varia tra i test e calerà nel tempo man mano che i primer attualmente disponibili verranno sostituiti da set di primer multiplex più ampi.

*b. Mutazioni del sito primer.* Come normalmente avviene nella risposta immunitaria, le cellule B aumentano la loro affinità anticorpale tramite mutazione dei nucleotidi dei loci dei geni per il recettore antigenico tramite un processo definito *ipermutazione somatica*. La mutazione dei siti di legame può precludere o compromettere l'attacco del primer (Fig. 1.9B). Un risultato falso negativo dovuto ad una mutazione del sito di priming è sospettabile in caso questo sia in conflitto con i dati clinici, morfologici e/o immunofenotipici, e la potenziale popolazione neoplastica sia di origine B dei centri germinativi e dei centri post-germinativi. In questo caso, il risultato falso negativo non può

essere risolto tramite implementazione con un set di primer esistenti, e richiede il targeting di ulteriori loci delle cellule B per ottenere un aumento della sensibilità (Amara *et al.*, 2006; Gameiro *et al.*, 2011; Payne *et al.*, 2011; Kokovic *et al.*, 2015).

- c. *Background policlonale.* Molti linfomi contengono proporzioni varie di linfociti non neoplastici, poiché i linfomi possono avere origine in organi linfoidi o da quadri infiammatori sottostanti. Se la proporzione di linfociti non neoplastici è significativa, il segnale clonale può essere oscurato dal sottofondo (*noise*) della popolazione policlonale (Fig. 1.9C). Il risultato falso negativo può essere sospettato, in questo caso, se questo fosse in conflitto con i dati clinici, morfologici ed immunofenotipici ed un numero significativo di linfociti non neoplastici fossero presenti.
- d. *Aberrazione cromosomica.* Le aberrazioni cromosomiche, come ad esempio le traslocazioni, possono eliminare o spostare i geni del recettore antigenico, precludendone l'amplificazione. Esempi ben noti in medicina umana sono le traslocazioni t(11;14) e t(14;18) nella proliferazione di cellule B mature. Nonostante le aberrazioni cromosomiche siano state documentate nelle neoplasie linfoidi degli animali, il loro effetto sui test di clonalità non è stato ancora indagato (Winkler *et al.*, 2005; Breen *et al.*, 2008). Inoltre, la possibilità di un riarrangiamento amplificabile su un secondo allele potrebbe ridurre l'incidenza di questo fenomeno come causa di falsi negativi.

2. Individuazione di clonalità in assenza di neoplasia (*espansione clonale benigna*).

L'identificazione di cloni benigni non può essere effettuata sulla base del profilo elettroforetico, ma richiede l'integrazione dei dati clinici, morfologici ed immunofenotipici. I cloni benigni possono essere osservati nelle seguenti circostanze:

- a. *Espansione clonale in risposta a stimolo antigenico.* A seguito della stimolazione antigenica, i linfociti vanno incontro ad espansione clonale secondo il normale sviluppo della risposta immunitaria. In molti casi, ciò coinvolge numerosi linfociti con diversa lunghezza del CDR3, fornendo così un profilo elettroforetico policlonale. In alcuni casi, tuttavia, alcuni cloni possono proliferare in maniera non proporzionata ed apparire come picchi distinti su un background policlonale meno distinto. In medicina umana questo fenomeno è stato documentato in risposta ad agenti infettivi, medicinali, neoplasie, o patologie autoimmuni (Alaibac *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1999; Magro *et al.*, 2003). In medicina veterinaria, le espansioni clonali benigne sono sospettate ma raramente documentate; situazioni associate a cloni benigni sono l'istiocitoma cutaneo benigno del cane in regressione, epatiti associate a ipersensibilità da farmaci, Ehrlichiosi e Leishmaniosi (Burnett *et al.*, 2003; Gentilini *et al.*, 2009).
- b. *Riarrangiamento canonico.* In medicina umana, alcune cellule T  $\gamma\delta$  utilizzano combinazioni V/J senza aggiunte significative di nucleotidi a livello del CDR3, fornendo quindi così un CDR3 minimamente diversificato (Delfau *et al.*, 1992; Breit *et al.*, 1994). Questi riarrangiamenti vengono definiti come "canonici" e

possono mimare una popolazione clonale su background policlonale. Questo tipo di riarrangiamento non è stato indagato in maniera sistematica negli animali domestici, ma l'analisi del *V/J usage* nelle cellule T del cane attraverso sequenziamento ad alte prestazioni ha mostrato un CDR3 minimamente modificato per i riarrangiamenti  $V\gamma 5-2/J\gamma 6-1$  (Fig. 1.10). Il significato di questi risultati nei test di clonalità del cane rimane ancora indefinito.

- c. *Amplificazione aspecifica*. L'amplificazione di sequenze di DNA oltre ai geni del recettore antigenico riarrangiati viene definita *amplificazione aspecifica*. La dimensione del picco può essere all'interno o all'esterno del *range* atteso (Langerak *et al.*, 2008). Le amplificazioni aspecifiche avvengono più frequentemente in campioni con poco DNA target, poiché queste prevalgono sui target specifici, se presenti. (Langerak *et al.*, 2012) Queste amplificazioni possono essere sospettate se cloni di dimensioni identiche ricorrono in campioni multipli nel tempo, soprattutto se si trovano al di fuori del range dimensionale del target aspettato. In medicina umana è stata compilata una lista di target aspecifici (Langerak *et al.*, 2012); poiché in medicina veterinaria non sono presenti set di primer standardizzati, l'identificazione di amplificazioni aspecifiche è strettamente legato all'esperienza dell'operatore. Infine, un picco clonale al di fuori dei range dimensionali attesi potrebbe rappresentare un'amplificazione specifica, ma questa dovrebbe essere confermata tramite sequenziamento per evitare diagnosi false positive.

### 3. Picchi di significato incerto.

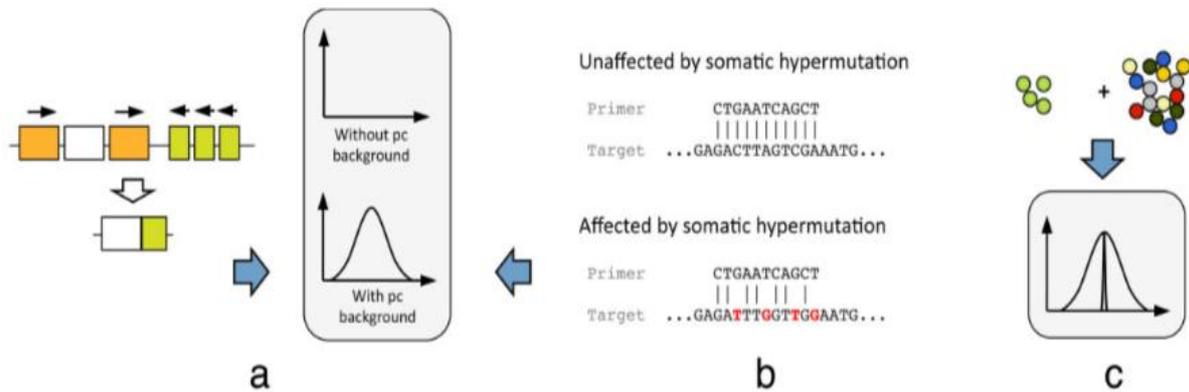
I profili elettroforetici possono essere misture di pattern archetipi o pattern che non rientrano in nessuna delle categorie stabilite. Interpretare un profilo elettroforetico con uno o più picchi in una curva Gaussiana (policlonale con minoranza clonale) può essere decisamente complesso; questo, infatti, può essere indicativo di un processo neoplastico con una componente reattiva concomitante, oppure rappresentare una risposta immunitaria dominante a seguito di una stimolazione antigenica. La differenziazione tra neoplastico e reattivo è stata ipotizzata sulla base dell'altezza relativa del picco (l'altezza assoluta divisa per l'altezza della curva policlonale) (Lee *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001; Sprouse *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2007), ma l'altezza relativa di un clone neoplastico è primariamente determinata dall'abbondanza di linfociti reattivi lesionali e dalla posizione del picco rispetto alla popolazione policlonale (Fig. 1.11); entrambi i parametri sono unici per ogni lesione. Inoltre, l'altezza relativa del picco è influenzata dalle proprietà del test, come le differenti efficienze di amplificazione tra le combinazioni di primers V/J e le condizioni del ciclatore. In maniera semplicistica, un clone neoplastico dovrebbe avere un'altezza relativa di picco bassa, mentre un clone reattivo dovrebbe avere un'altezza relativa di picco più elevata; secondo alcuni autori, non è importante identificare i cloni neoplastici sulla sola base dell'altezza relativa del picco, e il rifiuto di valori di *cut off* è in accordo con la percezione di questi valori per cui questi creerebbero un falso senso di accuratezza e porterebbero ad interpretazioni false-positive o false-negative (Langerak *et al.*, 2012). Nonostante sia desiderabile minimizzare la soggettività dei test di clonalità, è opinione di molti che

l'interpretazione dei risultati non possa basarsi su un algoritmo matematico, bensì richieda valutazioni dei dati clinici, morfologici e di immunofenotipo.

4. Profili pseudoclonali/*no specific products* (prodotti non specifici) (PSC/NSP).

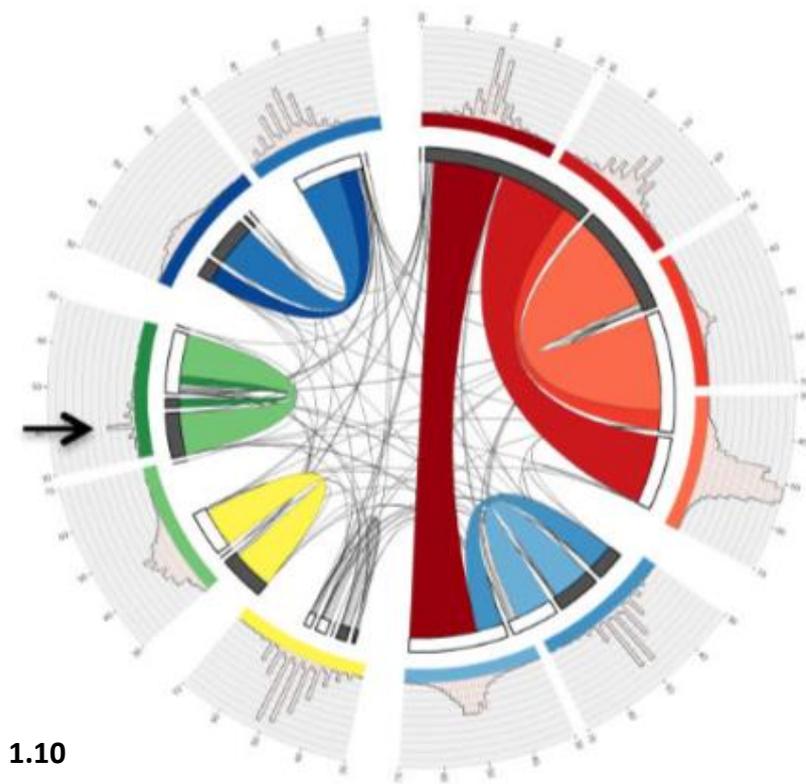
Questi profili elettroforetici possono essere indicativi di un processo neoplastico o reattivo, e possono risultare o dalla mancanza di primer che copra i geni riarrangiati, o dalla mutazione dei siti di binding dei primer, o da una scarsità di DNA target (la proporzione di DNA input disponibile per l'amplificazione). I geni del recettore antigenico sono unici poiché quel DNA target amplificabile non esiste a meno che la cellula abbia riarrangiato il locus di interesse. Anche se la quantità totale di DNA input per la reazione di PCR è standardizzata, la quantità di DNA target dipende dalla composizione cellulare del campione (Fig. 1.12). Le due principali ragioni di un DNA target insufficiente sono la mutazione del sito di primer durante l'ipermutazione somatica dei loci delle cellule B ed un basso numero di cellule linfoidi. In entrambi i casi sia la concentrazione totale di DNA che la misurazione della sua purezza possono risultare inadeguati. Per interpretare i profili PSC/NSP è essenziale stabilire la quantità di linfociti lesionali del rispettivo immunofenotipo, ovvero la quantità di linfociti B quando si interpretano i profili IGH, e la quantità di linfociti T quando si interpretano i profili TRG. Ad esempio, una lesione con un profilo elettroforetico IGH PSC/NSP che contenga un basso numero di cellule B, non sarebbe, verosimilmente, un linfoma B. Tuttavia, esistono eccezioni come i linfomi B T-cell rich in cui la popolazione reattiva T supera in quantità quella B, o situazioni in cui le cellule B perdano l'antigene e vi sia una mutazione del gene V con una progressione linfomatosa.

Se una lesione contiene numerose cellule B o T, un risultato PSC/NSP può essere attribuito a numerose motivazioni con diverse implicazioni per l'interpretazione del risultato. Prima tra tutte è che la scarsa amplificazione possa essere dovuta ad una quantità o integrità totale del DNA insufficiente, che può essere identificata tramite la quantificazione ed amplificazione del DNA di un gene controllo, rispettivamente. In questo caso, i risultati della clonalità non sono interpretabili. Se le quantità e qualità totali del DNA sono sufficienti, il profilo PSC/NSP potrebbe verosimilmente essere suggestivo di un processo neoplastico. Ciò è particolarmente vero nelle neoplasie a cellule B per via delle mutazioni del sito primer durante le ipermutazioni somatiche, o nelle neoplasie B o T per la copertura inadeguata del primer.

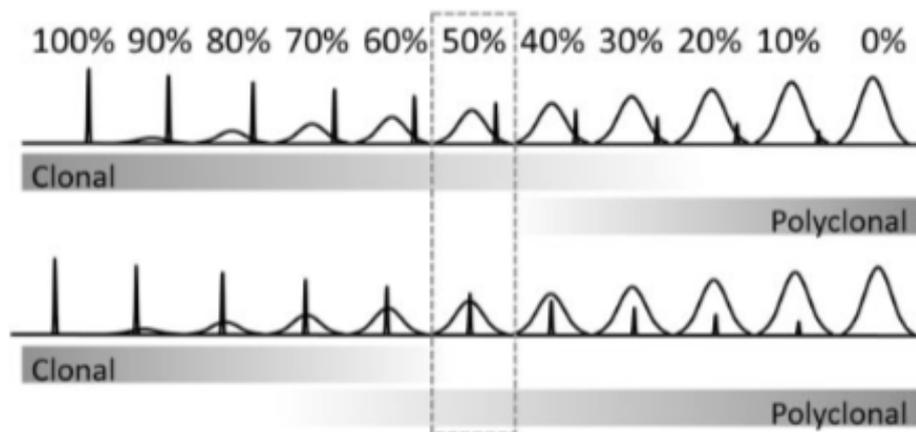


1.9

**Figura 1.9.** Cause più comuni di risultati falsi negativi. (a-b) Impossibilità di formare un picco clonale. (a) Uno o entrambi i geni utilizzati dal clone neoplastico non viene riconosciuto da nessuno dei primer del mix. Il risultato del profilo elettroforetico sarà policlonale, pseudoclonale in base al grado di background policlonale (pc). (b) Uno o entrambi i primers non riescono nell’annealing poiché la loro sequenza target è mutata durante l’ipermutazione somatica (lettere in rosso). (c) Si genera un picco clonale ma viene oscurato dal background policlonale. *Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Vet Pathol. 2016; 53:711-725.*



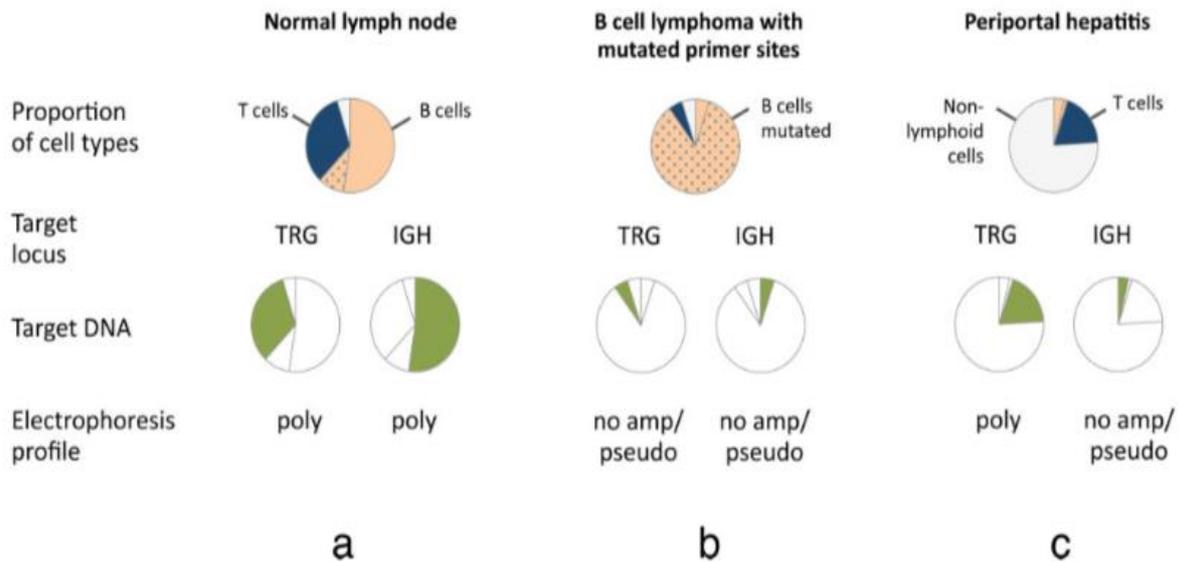
1.10



1.11

**Figura 1.10.** Valutazione del V/J usage del locus del TRG (T cell receptor gamma) mediante sequenziamento ad alte prestazioni. Questi dati consentono di indirizzare il set di primers verso i geni più comunemente usati e di escludere le combinazioni di V/J usage con bassa diversità. Nel diagramma interno, ogni segmento della circonferenza rappresenta un gene V (in *nero*) o J (in *bianco*). L'ordine dei segmenti è in senso orario (partendo dalle ore 12:00) secondo la topologia 5'→3'. Gli archi colorati che connettono i segmenti neri e bianchi rappresentano i riarrangiamenti tra i rispettivi geni; l'ampiezza dell'arco è relativo alla frequenza relativa del riarrangiamento della coppia V/J. Nel diagramma esterno sono presenti i profili elettroforetici degli accoppiamenti V/J più numerosi derivanti dai dati di sequenziamento (asse x: lunghezza del CDR3; asse y: frequenza). La freccia indica un riarrangiamento con bassa densità. *Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Vet Pathol. 2016; 53:711-725.*

**Figura 1.11.** Profili elettroforetici di due ipotetiche serie di diluizioni di DNA clonale (neoplastico) con DNA policlonale con ampiezza che possa imitare possibili situazioni reali (Keller and Moore, 2012) L'altezza relativa del picco di un clone è determinata dal grado di background policlonale e dalla localizzazione del picco rispetto al background. Se il picco è chiaramente al di fuori del background policlonale (sequenza in alto), può essere identificato più facilmente rispetto a quando coincide con quello del background (sequenza in basso). Ad esempio, il 50% di DNA clonale può risultare come un profilo elettroforetico *clonale con background policlonale* (box in alto) o *policlonale con minoranza clonale* (box in basso). *Fonte: Keller SM,*



### 1.12

**Figura 1.12.** Effetto del DNA target sui risultati PCR. Anche se tutti e tre i campioni ipotetici possiedono la stessa quantità di DNA input, il DNA che è effettivamente disponibile per l'amplificazione dei geni del recettore antigenico è diverso, poiché dipende dalla composizione cellulare del campione. (a) Linfonodo normale. Un linfonodo normale contiene un numero sufficiente di linfociti B (in color pesca) e T (in blu) da far ottenere un risultato policlonale sia con test dell'IGH che con TRG rispettivamente. (b) Linfoma a cellule B con siti di priming mutati. Anche se la lesione è composta prevalentemente da linfociti B, il locus IGH riarrangiato delle cellule neoplastiche non è "leggibile" dai primers del test e quindi amplificabile. (c) Epatite periportale. La maggioranza delle cellule sono di origine non-linfoide (in grigio), che abbassa la quantità relativamente abbondante di cellule linfoide predominata da linfociti T. Seppur siano presenti linfociti B sono in una quantità insufficiente per produrre un risultato significativo. *Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Vet Pathol. 2016; 53:711-725.*

### 1.5 L'importanza dell'integrazione con dati clinici, morfologici e di immunofenotipo

L'integrazione dei dati clinici, morfologici e di immunofenotipo è necessaria per minimizzare gli errori diagnostici durante le molteplici fasi di lavoro. In particolare, è necessaria per valutare l'adeguatezza del campione, la selezione del target, l'interpretazione corretta del profilo elettroforetico e per la determinazione della *lineage* cellulare (Groenen *et al.*, 2008).

Le valutazioni della lesione microscopica e dell'immunofenotipo prima del test di clonalità sono necessarie per un'adeguata selezione del target e possono facilitare l'identificazione del tipo di tumore (van Krieken *et al.*, 2007; Valli *et al.*, 2011).

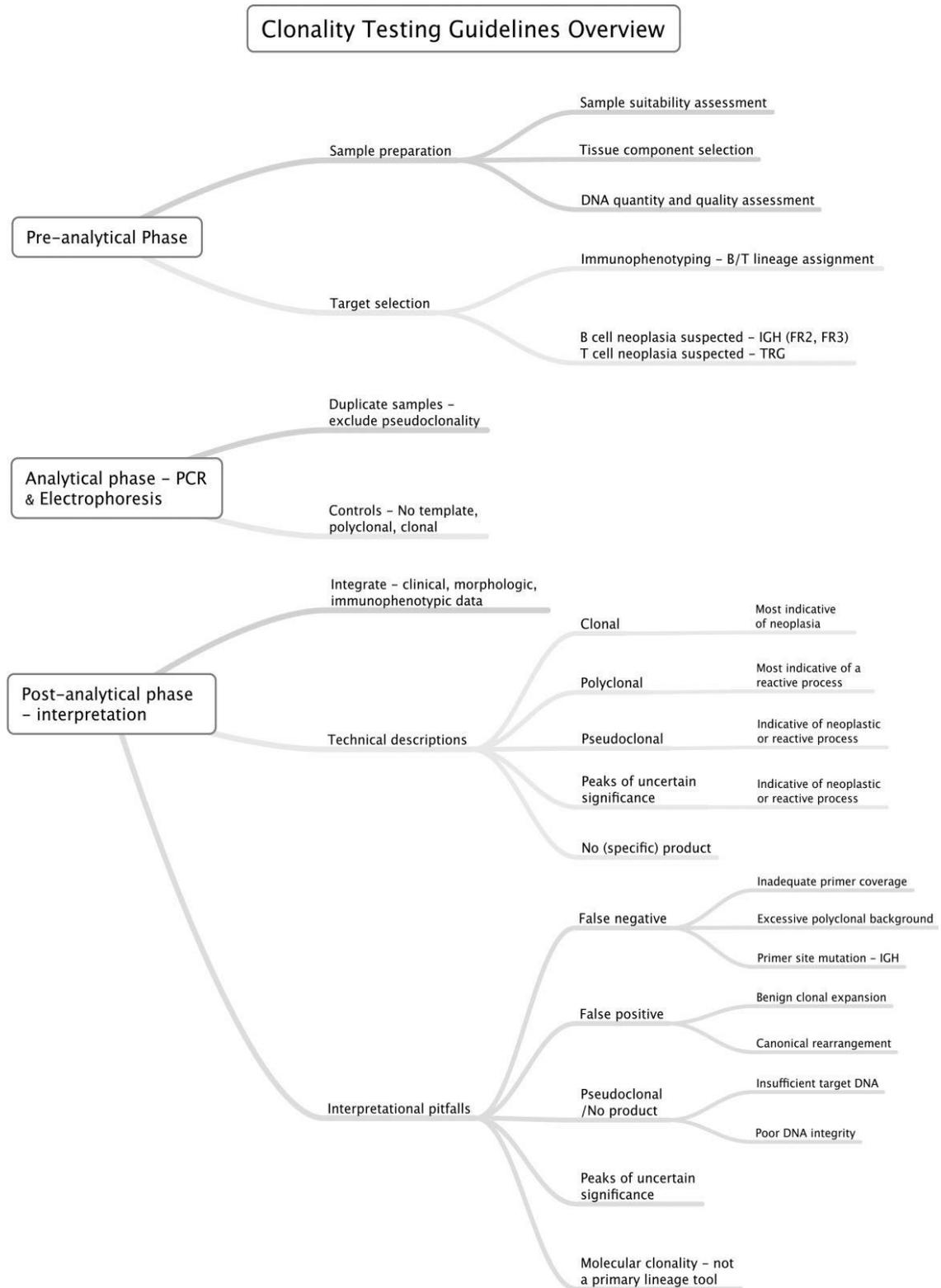
L'immunofenotipo è anche potenzialmente utile per spiegare risultati di PCR policlonali. Le ipermutazioni somatiche dei geni IGH V sono molto comuni nelle neoplasie a cellule B. Questo può portare al mancato *annealing* dei primer al DNA tumorale target, risultando in una assenza di amplificazione o pseudoclonalità. Ad esempio, in un campione con un adeguato numero di cellule B che morfologicamente è stato interpretato come linfoma B a grandi cellule, un eventuale risultato policlonale è verosimilmente riconducibile ad una ipermutazione somatica B o all'utilizzo di un primer che non riconoscesse il gene.

Spesso è necessaria l'aggiunta di ulteriori dati per l'identificazione di falsi positivi o falsi negativi: una causa comune di falsi negativi è un accentuato background policlonale; questo background può essere giustificato dalla presenza di un infiltrato cellulare misto, o di peculiarità architetturali come la formazione di follicoli, oppure alla distribuzione topografica delle cellule B e T, identificate attraverso immunofenotipizzazione.

I risultati falsi positivi sono potenzialmente più dannosi. Le espansioni clonali benigne sono state descritte in un limitato numero di circostanze; un caso di "pseudolinfoma" associato a ipersensibilità da farmaci è stato osservato, ad esempio, in un cane in terapia con carprofene

(Rimadyl®), che ha sviluppato un'epatite linfocitaria con innalzamento degli enzimi epatici e clonalità TRG; in seguito alla sospensione del farmaco, i parametri si sono rinormalizzati. Un altro esempio è l'istiocitoma benigno cutaneo del cane in fase di regressione, che è associato ad un abbondante infiltrato linfocitario a prevalenza di cellule T: nelle regressioni avanzate sono presenti poche cellule istiocitarie neoplastiche residue, e possono essere interpretati come linfomi cutanei. In questi casi l'analisi clonale è spesso positiva per TRG, confondendo ulteriormente la diagnosi.

In ultima istanza, l'immunofenotipo è essenziale per la determinazione della *lineage* della popolazione neoplastica. La situazione più frequentemente riscontrata dove i risultati clonali non sono rappresentativi del reale immunofenotipo delle cellule è il riarrangiamento *cross-lineage* del TRG nei linfomi diffusi a grandi cellule B o nelle neoplasie plasmacellulari (Fig. 1.13). La clonalità IGH può non essere rilevata per una inadeguata copertura dei primers, mutazioni nel sito di attacco dei primer, un eccessivo background policlonale o per una combinazione di questi. La valutazione del locus B complementare non soggetto all'ipermutazione somatica (ad esempio KDE) potrebbe essere un valido ausilio. Al contrario, la valutazione del riarrangiamento del gene del recettore antigenico può essere utile per il riconoscimento della *lineage* cellulare quando l'immunofenotipizzazione non può essere effettuata per via di una perdita antigenica pan-B o pan-T.



**Figura 1.13.** Proposta di linee guida per il test di clonalità linfoide in medicina veterinaria. E' fondamentale che il test di clonalità molecolare sia una procedura aggiuntiva che richiede l'integrazione dei dati clinici, morfologici e immunofenotipici per produrre dei risultati significativi. Il diagramma mostra le fasi principali dell'esecuzione ed interpretazione del test. *Fonte: Keller SM, Vernau W, Moore PF. Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. Vet Pathol. 2016; 53:711-725.*

## 1.6 Prospettive future

Il test di clonalità linfoide in medicina veterinaria è oggi per molti aspetti comparabile alla situazione dei primi anni '90 in medicina umana. I test di clonalità erano disponibili per i loci IGH e TCR, e i falsi negativi dovuti all'inadeguata copertura del set di primer disponibili era un'evenienza comune (Langerak *et al.*, 2012); inoltre, non esisteva un'armonizzazione tra gli standard di laboratorio, i set di primer, e l'interpretazione dei risultati. Da allora i test di clonalità in medicina umana si sono evoluti in uno strumento diffusamente riconosciuto, efficiente e standardizzato per la valutazione delle proliferazioni linfoidi (Langerak *et al.*, 2007). I progressi fatti in medicina umana possono essere un modello utile per il miglioramento di questo test in medicina veterinaria.

La base per il miglioramento del test in medicina umana è stata aumentare la sensibilità del test tramite lo sviluppo di set di primer multiplex sofisticati che coprissero tutti i possibili geni riarrangiati (van Dongen *et al.*, 2003). In medicina veterinaria la copertura inadeguata dei primer è un fenomeno prevalente, poiché gli interi profili genomici non erano sempre disponibili quando i test furono sviluppati e il sequenziamento dei singoli cloni ha consentito solo una valutazione limitata del *V/J usage* (Keller e Moore, 2012). Oggigiorno, i profili genomici sono disponibili per diverse specie di interesse, e il sequenziamento ad alte prestazioni ha facilitato la valutazione del *V/J usage* su larga scala (Lindblad-Toh *et al.*, 2005; Pontius *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2009; Wade *et al.*, 2009). Inoltre, i profili genomici consentono l'identificazione dei geni *in-silico*, che forniscono i dati di sequenza necessari per l'ottimizzazione del disegno dei primer e la struttura del locus necessaria per la corretta interpretazione (Hwang *et al.*, 2019). Molti loci di immunoglobuline e del recettore T-cell di interesse veterinario sono stati descritti in maniera completa, e i dati di sequenza di alcuni

sono disponibili su un database pubblico (*IMGT*) (Lefranc *et al.*, 2003; Massari *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2010; Mineccia *et al.*, 2012). Tuttavia, la maggioranza dei loci comprende un elevato numero di geni, richiedendo più primer di quanto sia fattibile per un'analisi multiplex in un singolo tubo. La conoscenza del *V/J usage* rende più consapevole il disegno dei primers, poiché i geni non riarrangiati non vengono considerati; ciò potrà portare alla disponibilità di un set di primer con aumentata sensibilità (Fig. 1.10).

I test di clonalità migliorati in medicina umana derivano dall'espansione dei loci target per includere TRB, TRD e IGL, tra gli altri, per compensare la sensibilità più bassa dei test individuali (van Krieken *et al.*, 2007; Langerak *et al.*, 2012). In medicina veterinaria, i test per target aggiuntivi non sono stati pubblicati, e le valutazioni routinarie di loci multipli non sono eseguiti per l'eccessivo costo; nonostante ciò, quando si hanno esiti inconclusivi dei test di clonalità sarebbe molto utile avere a disposizione dei saggi aggiuntivi. La necessità di test di clonalità che vadano oltre i loci standard IGH e TRG dovrebbe essere determinata caso per caso, soppesando la necessità ed il beneficio di informazioni aggiuntive rispetto al loro costo. Il sequenziamento ad alte prestazioni del *V/J usage* di tutti i loci recettoriali T-cell del cane ha facilitato lo sviluppo di test multiplex TRD, e di un test in fase di validazione che ha come target i *kappa-deleting-elements (KDE)* in cane, gatto e cavallo. Questo test non è influenzato dalle mutazioni del gene V e può provvedere informazioni valide se il test di clonalità IGH dovesse fallire.

In ultimo, uno dei maggiori successi in medicina umana è stata l'armonizzazione dei test tra le istituzioni. Un grande impulso per questo risultato è stata l'iniziativa B2/EC, che ha messo insieme 47 istituzioni di 7 paesi per stabilire dei set di primer standardizzati e le linee guida del test (van Dongen *et al.*, 2003). Una iniziativa simile in medicina veterinaria, per quanto

auspicabile, presenta diverse difficoltà: in primis, le sequenze del gene per il recettore antigenico differiscono per specie, per cui è necessario un set di primer specifico per ogni specie. Gli sforzi per la determinazione di set di primer concordi sarebbero quindi considerevolmente più elevati di quelli che si sono dovuti affrontare in medicina umana. In secondo luogo, esiste un'ampia gamma di diversi laboratori, set di primer ed equipaggiamento tecnico utilizzati nelle varie istituzioni. Terzo, un'iniziativa multi-istituzionale analoga a quella B2/EC richiede un cospicuo finanziamento.

Mentre l'armonizzazione dei set di primer tra i vari laboratori è difficile da raggiungere, i principi generali di interpretazione dei test di clonalità possono invece essere uniformati più facilmente, senza la necessità di studi multi-istituzionali. La letteratura delle ultime due decadi ha prodotto principi generali del test di clonalità che sono applicabili a qualsiasi specie, e che includono il riconoscimento dei pattern elettroforetici archetipi, misure base di controllo della qualità di laboratorio, e i criteri di interpretazione (Fig.1.13).

## Capitolo II · Contributo sperimentale

### **Lesioni nodulari linfoidi spleniche del cane:**

### **immunofenotipizzazione, attività proliferativa e clonalità.**

Le lesioni nodulari linfoidi spleniche del cane sono primariamente caratterizzate da aggregati follicolari di linfociti in associazione a quantità variabili di eritrociti stravasati, precursori emopoietici, plasmacellule ed elementi stromali, quali fibroblasti, cellule muscolari lisce ed istiociti (Valli *et al.*, 2017). In passato, la maggior parte di queste lesioni rientravano sotto la categoria diagnostica di “noduli fibroistiocitari”, con un grado da I a III sulla base della proporzione tra componente linfoide e stromale (Spangler e Kass, 1998; Bettini *et al.*, 2001). Recentemente, la riclassificazione del linfoma splenico del cane ha portato al riconoscimento di due tipi di linfoma B a basso grado (indolenti), il linfoma della zona marginale (MZL) e il linfoma mantellare (MCL) (Valli *et al.*, 2006; Valli *et al.*, 2011; Valli *et al.*, 2017). Moore *et al.* (2012) hanno inoltre proposto la categorizzazione delle lesioni iperplastiche come iperplasia nodulare linfoide (INL) ed iperplasia nodulare complessa (INC).

Nonostante queste lesioni siano frequenti nei cani, sono ancora poche le informazioni disponibili in letteratura riguardo il loro comportamento biologico, a causa del numero limitato di casi documentati e con follow-up a lungo termine, e dei criteri diagnostici poco standardizzati. Per queste ragioni, l'utilità di chemioterapia adiuvante secondariamente a splenectomia nei casi diagnosticati come linfomi indolenti è ancora ampiamente dibattuta (Valli *et al.*, 2006; Stefanello *et al.*, 2011; Flood-Knapik *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013; van Stee *et al.*, 2015).

L'immunofenotipizzazione ed il test di clonalità mediante PCR per il riarrangiamento del recettore antigenico (PARR) sono tecniche diagnostiche complementari all'istologia per confermare un sospetto di linfoma, ma nel caso dei linfomi indolenti splenici, la presenza di una popolazione cellulare polimorfa può limitare l'accuratezza di queste tecniche. La stima dell'attività proliferativa neoplastica tramite marker immunoistochimici come il Ki-67 può risultare utile nell'identificazione di tumore con un comportamento biologico più aggressivo (Maglennon *et al.*, 2008; Bergin *et al.*, 2011; Vascellari *et al.*, 2013). La valutazione della frazione di crescita tumorale ha un valore prognostico comprovato nei linfomi umani sia di alto che di basso grado, ed è correlata al grado tumorale nei linfomi canini (Hall *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1994; Fournel-Fleury *et al.*, 1997; Poggi *et al.*, 2017). L'indice di proliferazione Ki-67 (Ki-67 index) è stato inoltre applicato per differenziare le lesioni iperplastico-infiammatorie dai linfomi a livello intestinale e linfonodale nel cane (Bauer *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2015). L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di determinare l'utilità del Ki-67 index, dell'immunofenotipizzazione e del test di clonalità nella differenziazione dei linfomi indolenti splenici dalle lesioni iperplastiche linfoide o complesse. Inoltre, è stato indagato il significato prognostico di queste lesioni attraverso raccolta dei dati sul decorso clinico a lungo termine.

## **2.1 Materiali e Metodi**

### *Disegno dello studio e criteri di inclusione*

Le cartelle cliniche dell'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (Università di Bologna) sono state esaminate retrospettivamente per identificare cani con lesioni spleniche nodulari sottoposti a splenectomia nel periodo compreso tra Gennaio 2008 e Giugno 2017. Di questi casi, le relative sezioni istologiche

(spessore 4 µm) colorate con ematossilina-eosina e derivanti da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) sono state esaminate nuovamente al microscopio, includendo solamente i casi in cui le lesioni nodulari fossero costituite per oltre il 40% da componente linfoide organizzata in strutture follicolari.

Le informazioni cliniche incluse per i casi selezionati riguardavano segnalamento, segni clinici, numero di noduli splenici, diametro del nodulo, rilievi ecografici ulteriori, anomalie ematologiche e decorso clinico. I cani sottoposti a chemioterapia adiuvante sono stati esclusi dallo studio.

Sezioni istologiche seriali sono state sottoposte a saggio immunohistochimico con anticorpi anti-CD3 e CD79a e successivamente esaminate per la determinazione dell'immunofenotipo.

Sulla base dei riscontri istologici ed immunohistochimici, i casi sono stati classificati in:

- Iperplasia nodulare linfoide: lesioni caratterizzate per il 70% o più da linfociti frammentati a componente stromale/istiocitaria (nodulo fibroistiocitario di grado I); linfociti organizzati in follicoli discreti o tendenti alla confluenza, composti sia da piccoli linfociti che da linfociti medi/grandi; presenza regolare di linfociti T nelle aree circostanti i follicoli.
- Iperplasia nodulare complessa: lesioni con componente linfoide con caratteristiche simili a quelle dell'INL in associazione ad una proliferazione della componente stromale splenica (fibroblasti, cellule muscolari lisce, istiociti) occupante più del 30% della lesione (nodulo fibroistiocitario di grado II).
- Linfoma della zona marginale: lesioni caratterizzate da strutture follicolari irregolari e confluenti composte principalmente da linfociti B di medie dimensioni aventi una

moderata quantità di citoplasma e nucleo con cromatina marginata ed un singolo nucleolo visibile; scomparsa delle zone interfollicolari ad immunofenotipo T.

- Linfoma mantellare. Lesioni caratterizzate da strutture follicolari irregolari e confluenti composte principalmente da linfociti B di piccole dimensioni, con scarsa quantità di citoplasma e nucleo intensamente basofilo senza nucleoli evidenti; scomparsa delle zone interfollicolari ad immunofenotipo T.

Le categorie diagnostiche sopra descritte sono state ottenute mediante combinazione dei dati presenti in letteratura. La percentuale di cellule linfoidi proposte da Spangler e Kass per differenziare i noduli fibroistocitari di grado I e II è stata riutilizzata in questo studio per classificare rispettivamente i casi di INL ed INC (Spangler e Kass, 1998; Moore *et al.*, 2012). I noduli fibroistocitari di grado III (0-39% di cellule linfoidi) o noduli la cui componente stromale mostrasse marcati caratteri di anisocitosi ed anisocariosi, compatibili quindi con sarcoma splenico stromale o sarcoma istiocitario, non sono stati inclusi nello studio (Spangler e Kass, 1998; Moore *et al.*, 2012).

Ulteriori sezioni istologiche sono state inviate ai laboratori del Dipartimento di Biomedicina e Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova per l'analisi della clonalità attraverso PARR a livello del gene per la catena pesante dell'immunoglobulina (IgH) del recettore B. I casi con DNA non amplificabile sono stati esclusi. Sulla base dei risultati del test di clonalità, unitamente a quelli istopatologici ed immunoistochimici, le diagnosi iniziali sono state rivalutate ed eventualmente riformulate. I casi con diagnosi istopatologica inconfutabile di linfoma sono stati riconfermati tali, prescindendo dal risultato PARR. Al contrario, casi con diagnosi istologica di INL o INC sono stati riclassificati come linfomi nodulari in caso di risultato

positivo della PARR, a fronte della maggiore sensibilità di questa tecnica nell'individuare casi debuttanti di linfoma (Kisseberth *et al.*, 2007; Kiupel *et al.*, 2011). Nei casi con un risultato di policlonalità nonostante una diagnosi istologica ed immunoistochimica di linfoma, è stata eseguita anche PCR per il riarrangiamento del recettore gamma del recettore T (TCR $\gamma$ ), per escludere un riarrangiamento cross-lineage.

Per ciascun caso, il valore percentuale di aree CD3- e CD79a-positivo è stato ottenuto mediante analisi d'immagine, con lo scopo di individuare un possibile valore soglia per discriminare i linfomi dalle altre lesioni iperplastiche. Inoltre, è stata effettuata una doppia colorazione immunoistochimica CD79a/Ki67 per comparare l'attività proliferativa delle cellule B e non-B in linfomi e lesioni iperplastiche.

#### *Immunoistochimica*

Tre sezioni consecutive per ciascun caso sono state marcate con anticorpi anti-CD3, CD79a ed una doppia colorazione CD79a/Ki67. Sono stati impiegati anticorpi commerciali monoclonali mouse anti-human con reattività in tessuti canini precedentemente validata (CD3, clone CD3-12, Leukocyte Antigen Biology Laboratory, Peter F. Moore, University of California, Davis, CA, USA; CD79a, clone HM57, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA; Ki-67, clone MIB-1; Dako, Glostrup, Denmark) (Valli *et al.*, 2006; Sabbatini *et al.*, 2015).

L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata tramite incubazione per 30 minuti con perossido di idrogeno allo 0,3% in metanolo. Lo smascheramento antigenico è stato ottenuto mediante 2 cicli in microonde a 750 W, in buffer EDTA a pH 8.0 (per gli anticorpi CD3 e CD79a), oppure mediante 4 cicli a 750W in buffer citrato a pH 6.0 (per la doppia colorazione CD79a/Ki-67). Le sezioni sono state incubate overnight a 4°C in camera umida con l'anticorpo primario. L'anticorpo CD3 è stato diluito 1:20 in blocking solution (10% goat serum in buffer fosfato);

l'anticorpo CD79a è stato diluito 1:750 in blocking solution; per la doppia colorazione CD79a/ki67, gli anticorpi sono stati miscelati in un'unica soluzione ad una diluizione di 1:200 (CD79a) e 1:400 (Ki-67) in blocking solution.

I siti di legame dell'anticorpo primario sono stati identificati mediante legame con anticorpo secondario biotinilato (Dako) alla diluizione di 1:200 in blocking solution. Le sezioni sono state successivamente incubate con kit commerciale streptavidina-biotina-perossidasi (Vectastatin Elite ABC Kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) per 30 minuti; come cromogeno è stata utilizzata 3,3'-diaminobenzidina (DAB tablets, Diagnostic BioSystem, Pleasanton, CA, USA). Le sezioni sono state poi controcolorate con ematossilina di Papanicolaou, disidratate e coperte con montante.

Sezioni di linfonodo di cane sono state usate come controllo positivo, mentre il controllo negativo è stato ottenuto mediante omissione dell'anticorpo primario.

### *Analisi d'Immagine*

Le sezioni colorate con CD3 e CD79a sono state scannerizzate a basso ingrandimento (40x) con un microscopio digitale Coolscope (Nikon, Minato, Japan). Le immagini ottenute sono state processate con un software di analisi d'immagine (ImageJ, National Institute of Health, USA) per calcolare l'area occupata dalle cellule positive a CD3 e CD79a, espressa come valore percentuale delle aree immunomarcate sull'area totale del nodulo.

Le sezioni con doppia colorazione CD79a/Ki-67 sono state analizzate a medio ingrandimento (100x) per poter selezionare le aree con più elevata attività proliferativa. Nel contesto di queste ultime, sono stati fotografati 10 campi a forte ingrandimento (400x): 5 foto sono state eseguite nelle aree CD79a-positive e 5 nelle aree CD79a-negative. In ogni immagine, il numero di cellule Ki-67 positive e negative è stato valutato mediante conta manuale (ImageJ – cell

counter). Il Ki-67 index delle cellule CD79a-positive e quelle delle CD79a-negative è stato calcolato come valore medio percentuale dei nuclei Ki-67-positivi nelle 5 immagini corrispondenti.

### *PARR*

Il DNA genomico è stato estratto da sezioni di 10  $\mu\text{m}$  di tessuti FFPE attraverso il Kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Hilden, Germany), secondo le istruzioni del produttore. La quantità e la purezza del DNA estratto sono stati verificati mediante spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Per testare l'integrità del DNA genomico e la sua amplificabilità, è stata amplificata una regione di 130 bp nella regione permanente del gene IgM, utilizzando la seguente coppia di primer suggerita da Burnett *et al.* (2003): Sigmf1: 5'-TTCCC CTCATCACCTGTGA-3' e Sr $\mu$ 3: 5'-GGTTGTTGATTGCACTGAGG-3'. La clonalità della regione IgH è stata verificata attraverso due differenti saggi. Il primo tramite una modificazione di quello descritto da Burnett *et al.* (2003): il primer forward CB1 (5'-CAGCCTGAGAGCCGAGGACAC-') per la regione VH è stato mantenuto, mentre il primer reverse JHrev (5'-CAGACCCAGACACCCTCATT-3') per la regione JH è stato disegnato ex novo da Aricò A. (dati personali). Questo nuovo primer è stato disegnato attraverso una sequenza consenso ottenuta dai cloni IgH di cinque cani portatori di linfoma B (caseload dell'articolo Aresu *et al.*, 2014). Il saggio è stato eseguito alle condizioni di amplificazione riportate di seguito. Per ciascun primer sono stati usati 12.5 pmoli in un volume di reazione finale di 25  $\mu\text{l}$ . La specificità del saggio è stata testata su controlli positivi (linea cellulare CLBL1 e campioni con diagnosi di linfoma B) (Rütgen *et al.*, 2010) e negativi (linfonodi iperplastici, linea cellulare OSW e campioni di linfomi T) (Kisseberth *et al.*, 2007). La sensibilità di questi saggi è stata testata tramite diluizione acquosa seriale del DNA della linea

cellulare CLBL-1 a partire da una quantità iniziale di 80 ng/ $\mu$ L; ogni livello di diluizione è stato testato in doppio. L'ultimo saggio ripetibile con un singolo picco ben demarcato è stato ottenuto con una quantità di 1.25 ng di DNA in un volume di reazione finale di 25  $\mu$ L. Nel secondo saggio sono stati utilizzati i primers precedentemente pubblicati da Valli *et al.* (2006) Gli ampliconi previsti erano tra le 200 bp e le 180 bp per il primo e per il secondo saggio, rispettivamente.

Per il primo saggio, dopo la prima denaturazione a 98°C per 45 secondi (s), la reazione consisteva in 8 cicli a 98°C per 5 s; una fase di annealing a temperatura minore tra i 65.5°C a 61.5°C per 5 s e a 72°C per 5 s; 28 cicli a 98°C per 5 s, 60.5°C per 5 s, 72°C per 5 s, ed una estensione finale a 72°C per 60 s. Per il secondo saggio, il profilo termico era il seguente: 98°C per 45 s, seguito da 7 cicli a 98°C per 5 s, 72°C per 5 s, e l'estensione finale a 72°C per 60 s (Valli *et al.*, 2006). Inoltre, due saggi differenti sono stati utilizzati per l'analisi clonale TCR $\gamma$ . Nel primo saggio, sono stati usati i primers disegnati da Valli et al (2006) e modifiche minori sono state apportate al protocollo termico (uno step di denaturazione a 98°C per 45 s; 7 cicli di denaturazione a 98°C, annealing per 5 s a temperatura ribassata tra 66°C e 60°C, allungamento a 72°C per 5 s; 28 cicli di: 98°C per 7 s, 59.5°C per 7 s, 72°C per 7 s; allungamento finale a 72°C per 60 s). Il prodotto di PCR atteso era circa 111 bp. Nel secondo saggio, i 6 primers forward (V2-1, V2-2, V3-1, V3-2, V7-1, V7-2) e i 6 reverse (Ja, Jb, Jc, J2-1, J5-1, J6-2) pubblicati da Keller e Moore (2012) sono stati usati in una PCR multiplex (Keller *et al.*, 2012). La denaturazione iniziale (a 98°C, 45 s) è stata seguita da 4 cicli con temperature ribassate nello step di annealing (98°C, 5 s; da 63°C a 61.5°C, 5s; 72°C, 5 s), 28 cicli a: 98°C, 5 s; 61°C, 5 s; 72°C, 5 s ed allungamento finale a 72°C per 90 s. Il risultato atteso era multipli ampliconi di dimensioni diverse (da 65 a 170 bp).

Tutte le PCR sono state eseguite in un volume finale di 25  $\mu$ L, con 80-100 ng di DNA genomico; per effettuare il touch down è stata utilizzata Taq Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in un termociclatore ProFlex (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

I campioni sono stati sottoposti ad analisi eteroduplex: denaturazione a 95°C per 10 minuti in un ciclatore T-1 Personal Thermal (Biometra, Göttingen, Germany) seguita da re-annealing lento su ghiaccio in 1 ora. Ogni campione è stato amplificato in doppio, insieme ad un controllo negativo (acqua) ed uno positivo (linea cellulare CLBL-1 per l'IgH, e linea cellulare OSW per TCR $\gamma$ ).

Dieci  $\mu$ L di ogni campione sono stati analizzati in gel di agarosio al 4% TBE (UltraPure Agarose 1000, Invitrogen, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) su sistema di elettroforesi orizzontale Mini L (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) a 100 V per 70 minuti. I risultati sono stati visualizzati e documentati grazie al sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

L'amplificazione policlonale, coerente con un processo non neoplastico, è stata definita come la presenza di una banda ampia od un laddering profile in almeno uno dei due saggi. Il risultato è stato invece considerato clonale (coerente con linfoma) in presenza di 1-4 bande ben definite in entrambi i saggi. I campioni sono stati giudicati come pseudoclonali quando le bande non erano riproducibili (Keller *et al.*, 2012).

#### *Analisi Statistica*

I dati sono stati analizzati mediante software SPSS (SPSS, Inc., IBM, Chicago, IL, USA). Valori di significatività  $P \leq 0,05$  sono stati considerati come significativi.

Quando appropriato, i dati sono stati testati per la distribuzione normale usando il test di normalità omnibus D'Agostino and Pearson. I valori sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard in caso di distribuzione normale, e come mediana con range o range interquartile (IQR) in caso di distribuzione non normale. Le differenze tra le variabili esaminate in base alla diagnosi finale sono state valutate mediante test di Fisher o test del  $\chi$  quadrato (variabili qualitative), Student *t* test (variabili quantitative, distribuzione normale), e Mann Whitney *U* test (variabili quantitative, distribuzione non normale). Le variabili valutate comprendevano sesso, età, peso corporeo, presenza di segni clinici, presenza di una massa addominale palpabile all'esame fisico, presenza di splenomegalia diffusa, presenza di noduli splenici multipli, diametro del nodulo, rottura della massa, anomalie ematologiche, le aree CD79a-positive, le aree CD3-positive ed il Ki-67 index.

L'analisi mediante curva ROC (receiver operating characteristic curve) è stata eseguita per individuare il valore soglia più idoneo delle aree CD3-positive, CD79a-positive e del Ki-67 index per identificare i casi di linfoma.

Il metodo del prodotto limite Kaplan-Meier è stato applicato per stimare il tempo di sopravvivenza post-splenectomia, e la rilevanza prognostica della diagnosi è stata valutata mediante log-rank test. Il tempo di sopravvivenza (ST) è stato definito come numero di giorni dalla data di splenectomia fino all'ultima data riportata in cui il paziente fosse vivo. Cani deceduti per malattia legata o non legata al linfoma sono stati registrati come eventi; i cani vivi alla fine dello studio sono stati censurati.

## 2.2. Risultati

I dati demografici completi, i dettagli istopatologici e clinici dei 35 casi di lesioni nodulari linfoidi spleniche sono riportati in Tabella 1.4

*Informazioni cliniche*

Trentacinque cani sono stati inclusi nello studio: 18 maschi (51%; 16 interi e 2 castrati) e 17 femmine (49%; 9 intere e 8 sterilizzate). L'età media era  $9,5 \pm 2,8$  anni (range 4-17). La razza maggiormente rappresentata era lo Yorkshire Terrier (n = 4). Undici cani erano di piccola taglia ( $\leq 10$  kg), 15 di taglia media (11-25 kg) e 9 cani erano di taglia grande ( $> 25$  kg). Il peso corporeo medio era  $17,8 \pm 10,8$  kg (range 3-45 kg). I segni clinici erano presenti in 10 casi (29%) ed includevano disoressia, perdita di peso, astenia, vomito e dolore addominale. In 7 di questi animali era presente una massa addominale palpabile all'esame fisico. Nei rimanenti 25 casi, il nodulo splenico è stato rilevato accidentalmente durante ecografie addominali effettuate per altre cause (ad esempio stadiazione di altri tumori, ingestione di corpi estranei, diagnosi di gravidanza, enteropatie, cistiti, check-up di routine per patologie croniche).

In 11 casi (31%), la milza mostrava noduli multipli (2-3). In 6 di questi, solo il nodulo di diametro maggiore è stato sottoposto ad analisi istologica. Nei 5 casi rimanenti, gli altri noduli sono stati esaminati e diagnosticati come iperplasia nodulare linfoide o ematomi; di ciascun caso, solo il nodulo di diametro maggiore è stato incluso nello studio. In 10 casi (29%) era riportata anche splenomegalia diffusa. Il diametro medio delle 35 lesioni selezionate era  $2,5 \pm 1,6$  cm (range 0,6-6 cm). In 2 casi (6%) c'era evidenza di rottura della capsula splenica con adesione dell'omento. Solo in un caso è stato riscontrato ecograficamente un lieve aumento dei linfonodi digiunali. Non è stato riscontrato nessun altro caso di linfadenomegalia addominale. In 8 casi è stata riportata anche una epatopatia diffusa di verosimile origine degenerativa. Quattro cani riportavano segni di enteropatia cronica e altri 4 di nefropatia. Due avevano noduli surrenalici, mentre un cane presentava criptorchidismo monolaterale con

neoplasia del testicolo ritenuto. Nessun'altra lesione neoplastica sospetta è stata riscontrata all'esame ecografico. Nessuno dei casi presentava versamento addominale.

In 9 cani (25.7%) erano presenti anomalie ematologiche erano presenti, tra le quali anemia (HCT < 37%; n=5), neutrofilia (<12,000/  $\mu$ L; n=5), monocitosi (> 1,400/  $\mu$ L; n=2) e trombocitosi (> 500,000/  $\mu$ L; n=4).

### *Diagnosi*

Sulla base dell'istologia e dell'immunofenotipo, 10 noduli (29%) sono stati diagnosticati come INL, 12 (34%) come INC, 11 (31%) con MZL e 2 (6%) come MCL (Fig. 1.14-17)

Con l'analisi PARR, 14 casi (40%) hanno mostrato riarrangiamento monoclonale IgH; di questi, 12 (86%) erano stati diagnosticati istologicamente come linfomi nodulari, mentre 2 erano stati diagnosticati come INC. La rivalutazione istologica ha riconfermato la presenza sia di linfociti marginali che mantellari nei due casi diagnosticati precedentemente come INC; tuttavia, sulla base della morfologia della popolazione cellulare linfoide, i casi sono stati riclassificati come MCL. Un caso diagnosticato come MZL sulla base istologica ed immunofenotipica è risultato policlonale per il riarrangiamento IgH. Successivamente, anche l'analisi per il riarrangiamento TCR $\gamma$  è risultata policlonale. In base ai criteri riportati precedentemente, il caso è stato comunque classificato come linfoma.

Complessivamente, al termine delle analisi, 15 casi (43%) sono stati diagnosticati come linfomi nodulari (11 MZL e 4 MCL), e 20 (57%) come lesioni iperplastiche (10 INL e 10 INC).

Secondo il sistema di grading proposto da Spangler e Kass, 19 noduli (54%) sarebbero stati classificati come grado I, e 16 (46%) come grado II, dove nel grado I erano incluse tutte le INL e 9 MZL, e nel grado II tutte le INC, tutti i MCL e 2 MZL.

*Analisi statistica*

Complessivamente, la percentuale media delle aree CD79a-positive era  $28,2\% \pm 12,7\%$ , mentre la percentuale media delle aree CD3-positive era  $14,0\% \pm 7,2\%$ . La percentuale delle cellule CD79a-positive era significativamente più alta nei casi classificati come linfoma nodulare (media  $\pm$  DS,  $36,3 \pm 10,6\%$ ) rispetto a quelli classificati come iperplasie (media,  $22,1 \pm 10,7\%$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 1.18). Nessuna differenza significativa è stata riportata tra MZL e MCL e tra INL e INC. La percentuale di aree positive al CD3 non era associata alla diagnosi finale.

Il Ki-67 index mediano delle aree CD79a-positive era  $3,0\%$  (IQR,  $1,7-5,5\%$ ). Il Ki-67 index era significativamente più alto nei casi diagnosticati come linfoma nodulare (mediana,  $5,5\%$ ; IQR,  $3,3-6,2\%$ ) rispetto a quelli diagnosticati come iperplasia (mediana,  $2,1\%$ ; IQR,  $1,2-3,0\%$ ;  $P=0,001$ ; Fig. 1.19). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra MZL e MCL, o tra INL e INC. La mediana del Ki-67 index delle aree CD79a-negative ( $19,6\%$ ; IQR,  $10,4-30,4\%$ ) era significativamente più alta di quella osservata nelle aree CD79a-positive ( $P < 0,001$ ). Il Ki-67 index non era associato con la diagnosi finale ( $P = 0,129$ ; Fig. 1.20).

L'analisi mediante curve ROC ha identificato i seguenti valori soglia come maggiormente indicativi di linfoma nodulare: aree positive al CD79a  $> 28\%$  (sensibilità,  $75\%$ ; specificità,  $80\%$ ; area sotto la curva,  $0,8$ ;  $95\%$  IC,  $0,7-1,0$ ;  $P = 0,001$ ); Ki-67 index  $> 3\%$  (sensibilità,  $87\%$ ; specificità,  $75\%$ ; area sotto la curva,  $0,8$ ;  $95\%$  IC,  $0,7-1,0$ ;  $P = 0,001$ ).

Altre variabili significativamente associate alla diagnosi di linfoma nodulare erano la presenza di segni clinici ( $P = 0,008$ ) e il diametro del nodulo maggiore (mediana,  $3,4$  cm contro  $1,8$  cm;  $P = 0,002$ ; Tabella 1.4). Non era presente nessuna differenza significativa tra INL e INC in riferimento alle variabili clinicopatologiche considerate.

### *Analisi di sopravvivenza*

Diciassette cani (49%) sono deceduti per cause non collegate alla patologia splenica dopo una mediana di 1087 giorni post-splenectomia (IQR, 633-1292 giorni). Le cause di morte includevano infezioni batteriche, insufficienza renale cronica, insufficienza cardiaca, dilatazione gastrica e volvolo, tumore mammario, tumore prostatico, enteropatia cronica, iperadrenocorticismo e ipoaldosteronismo. I restanti 18 cani erano ancora vivi alla fine dello studio, con un follow-up mediano di 870 giorni (IQR, 569-1225). Il tempo complessivo di sopravvivenza mediana era 1282 giorni, senza alcuna differenza significativa tra linfomi nodulari (1216 giorni; 95% IC, 921-1511) e iperplasia (1302 giorni; 95% IC, 1231-1373;  $P = 0,849$ ; Tabella 1.4; Fig. 1.22).

### **2.3 Discussione**

Questo studio descrive i riscontri clinici e patologici di un gruppo di cani con lesioni nodulari spleniche trattate solamente tramite splenectomia. Approssimativamente il 40 dei casi erano stati diagnosticati come linfomi indolenti, mentre i restanti erano riferibili ad iperplasie nodulari, sia di tipo semplice che complesso. Nessuno dei cani con linfoma nodulare è deceduto a causa della malattia neoplastica durante un follow-up mediano di più di 3 anni, e non vi erano differenze nel decorso clinico tra i cani con malattia neoplastica e quelli con noduli iperplastici.

Anche in medicina umana il MZL pare avere un buon decorso con la sola splenectomia, e la risposta alla chemioterapia non risulta soddisfacente. Complessivamente, il MZL splenico ha una prognosi migliore del linfonodale, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 81-95% (Mazloom *et al.*, 2010; Olszewski *et al.*, 2013).

Nel cane sono scarse le informazioni riguardo il decorso a lungo termine dei linfomi indolenti. La forma puramente splenica sembra avere una prognosi migliore di quelle linfonodali (Valli *et al.*, 2011; Flood-Knapik *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013), e la splenectomia è attualmente considerata la terapia d'elezione (Flood-Knapik *et al.*, 2013). Nonostante ciò, sono state riportate l'evoluzione a linfoma diffuso e il coinvolgimento di fegato ed altri organi linfatici (Valli *et al.*, 2006) e pochi studi hanno valutato i benefici della chemioterapia adiuvante (Stefanello *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2013).

In questo studio, la milza era l'unico organo coinvolto all'indagine ecografica, e nessun cane mostrava linfadenomegalia ilare o periferica. Inoltre, in nessun caso in cui fosse stato diagnosticato in precedenza un MZL splenico, è stata riscontrata linfocitosi alle indagini ematologiche, indice di uno stadio leucemico (Flood-Knapik *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013). Questo può giustificare l'eccellente decorso clinico di tutti i cani presenti nello studio.

Complessivamente, i dati di sopravvivenza che emergono da questo studio sono sovrapponibili a quelli dello studio originale di Spangler e Kass (1998), dove una vasta casistica di lesioni nodulari spleniche era stata relazionata all'outcome, e nessuno dei 46 cani con lesioni di grado I o II (quelle con meno del 60% di cellule fibroistiocitarie) è deceduto spontaneamente nei 12 mesi seguenti la splenectomia (Spangler e Kass, 1998).

In un recente report sul linfoma splenico del cane, i fattori prognostici negativi includevano emoaddome, aumento di volume dell'addome, letargia e anoressia (van Stee *et al.*, 2015). In questo studio, i segni clinici e un diametro tumorale maggiore erano significativamente associati alla diagnosi di linfoma, ma non influivano sul tempo di sopravvivenza. Il numero di casi riportato in questo studio è, ad ogni modo, troppo basso per poter trarre conclusioni definitive sull'outcome di questa patologia.

La distinzione istologica tra iperplasia linfoide e linfoma nodulare è ancora considerata impegnativa, a causa delle vaste sovrapposizioni a livello sia morfologico che strutturale, caratteristiche che sembrano avvalorare l'ipotesi di un *continuum* patologico tra queste due patologie. La conferma del monomorfismo cellulare e la determinazione del fenotipo mediante immunistochemica è considerata essenziale nella diagnosi di linfoma diffuso (Valli *et al.*, 2011), ma può sembrare di utilità limitata in caso di linfoma nodulare, poiché il monomorfismo può essere assente nella lesione precoce, e perché il pattern follicolare è di per sé suggestivo di immunofenotipo B. Tuttavia, l'immunistochemica può risultare utile nell'evidenziare i margini dei follicoli, consentendo così una più accurata valutazione della dimensione, della forma e della confluenza degli stessi. Anche nello studio di Moore *et al.* (2012), l'immunistochemica si è rivelata essenziale per riclassificare 32 noduli splenici precedentemente diagnosticati come noduli fibroistiocitari (Moore *et al.*, 2012) Per questa ragione, un approccio a due step che includa sia l'istologia che l'immunistochemica può essere indicato nei casi di lesioni spleniche nodulari linfoidi nel cane. La coerenza di questo approccio diagnostico è stata confermata in questo studio dalla buona correlazione con la PARR, e da parametri più oggettivi come la quantificazione delle aree a immunofenotipo B e la valutazione dell'attività proliferativa mediante analisi d'immagine.

Flood-Knapik *et al.* (2013) non hanno evidenziato alcun significato prognostico nell'analisi del Ki-67 index in una coorte più ampia di casi di linfoma; tuttavia, solo 6 dei linfomi nello studio erano di origine splenica. Inoltre, l'utilità diagnostica del Ki-67 index per differenziare i linfomi indolenti splenici del cane dalle forme iperplastiche non è mai stata indagata. In questo studio si è mirato ad entrambi gli obiettivi, ma la mancata relazione tra le diagnosi ed il decorso clinico non ha reso possibile la validazione del Ki-67 index come marker prognostico. Al

contrario, è stata invece evidenziata un' utilità diagnostica di questo marker, dimostrando un' attività proliferativa significativamente più elevata nei linfociti B di MZL e MCL quando comparati ai noduli iperplastici. L' aggiunta del marker immunoistochimico CD79a nella prova ha permesso di discernere con precisione le cellule B in proliferazione (con nucleo o citoplasma positivi) dalle altre cellule in proliferazioni (che presentavano solo nucleo positivo). È interessante notare come l' attività proliferativa fosse più elevata nelle aree non-B, nonostante non fossero coinvolte primariamente nel processo iperplastico/neoplastico. Questo dato suggerisce come la valutazione standard del Ki-67 index in campi randomizzati o nelle aree a più elevata proliferazione (senza doppia colorazione immunoistochimica), all' atto pratico, possa risultare in una sovrastima della proliferazione neoplastica, orientando erroneamente verso una diagnosi v di linfoma.

L' indagine della clonalità nelle proliferazioni linfoidi è considerato un importante supporto diagnostico all' esame istologico (Kiupel *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2015; Sabattini *et al.*, 2016), ma secondo le recenti linee guida, i saggi di clonalità non devono essere assunti come test indipendenti, bensì supportare e seguire i riscontri clinici, morfologici e di immunofenotipo. Inoltre, l' attribuzione di una *lineage* cellulare tramite test di clonalità è fortemente sconsigliata per via dei riarrangiamenti *cross-lineage* che possono verificarsi (Keller *et al.*, 2016). Infine, il test di clonalità è considerato non necessario nei quadri istologici conclamati di neoplasia linfoide (Keller *et al.*, 2016).

In questo lavoro, la clonalità della regione IgH è stata indagata con due diversi saggi precedentemente pubblicati, il primo secondo Valli *et al.* (2006) il secondo di Burnett *et al.* (2003), nonostante quest' ultimo sia stato condotto mediante apporto di modifiche che, alle condizioni del nostro laboratorio, forniscono migliori risultati in termini di specificità e

sensibilità. La concordanza complessiva tra la PARR e la prima diagnosi istologica era buona, con più del 90% di diagnosi concordi. Dei casi diagnosticati come linfomi nodulari, solo uno è risultato negativo per la clonalità dell'IgH. In questo caso, anche il riarrangiamento *cross-lineage* è stato escluso mediante analisi PCR del TCR $\gamma$ , ma in virtù del quadro istologico, il caso è stato comunque classificato come linfoma. Questo risultato è in accordo con la sensibilità del test PARR, che può portare falsi negativi fino al 30% dei casi. La falsa negatività può essere attribuita a molteplici cause, tra cui un riarrangiamento genetico non riconosciuto dai primers, un riarrangiamento parziale di IgH, difetti cromosomiali, o presenza di un importante background policlonale (Valli *et al.*, 2006). Una causa non trascurabile risiede anche nell'eccessiva frammentazione del DNA per i campioni fissati in formalina, ma in questo studio la presenza di DNA amplificabile è stata valutata per ogni campione prima dell'analisi clonale. La diagnosi iniziale di iperplasia è stata modificata sulla base del test di clonalità soltanto in 2 casi. Questi sono stati considerati come possibili forme debuttanti di linfoma nodulare non ancora riconoscibile su una base istologica, e quindi riclassificati come neoplastici sulla base dei risultati della clonalità. Non è possibile, tuttavia, escludere che si tratti di risultati falsi positivi in seguito ad espansione clonale secondaria a stimolo antigenico.

Lo studio qui presentato non fornisce, tuttavia, criteri diagnostici innovativi per la differenziazione tra iperplasia linfoide e complessa; tale nomenclatura è stata proposta solo di recente, e non sono ancora stati determinati dei criteri oggettivi per quantificare la proporzione tra componente stromale e linfoide che possano condurre ad una precisa diagnosi di queste due entità (Moore *et al.*, 2012). Molti patologi, per questo motivo, trovano maggior sicurezza nell'esprimersi ancora con la vecchia classificazione (Spangler e Kass, 1998). Per una miglior riproducibilità e per favorire una continuità tra le due terminologie, abbiamo

adottato la nuova classificazione applicando i valori *cut-off* proposti in quella precedente, facendo coincidere l'INL con i noduli fibroistiocitari di grado I, e la INC con quelli di grado II. La scelta di includere le INC nello studio deriva dalla considerazione del fatto che entrambe le iperplasie debbano essere considerate tra le diagnosi differenziali dei linfomi nodulari, soprattutto il MCL, che può essere associato ad una prominente componente stromale. Tuttavia, la distinzione tra le lesioni spleniche nodulari che contengono più o meno il 70% di componente linfoide è sembrata piuttosto arbitraria nel nostro studio, dal momento che non sono emerse differenze nel decorso nella PARR o nella doppia colorazione CD79a/Ki-67.

Concludendo, da questo studio emergono dati incoraggianti in merito alla prognosi delle lesioni nodulari spleniche linfoidi del cane, e vengono proposti nuovi elementi per una più accurata differenziazione dei linfomi nodulari splenici dalle lesioni iperplastiche. Per una diagnosi corretta, la valutazione microscopica dell'architettura e della morfologia delle lesioni a basso-medio ingrandimento è da considerarsi discriminante, ma l'immunofenotipizzazione e la PARR possono essere di supporto nelle diagnosi di lesioni precoci. Anche la valutazione dell'attività proliferativa con immunistochemica per Ki-67 può essere d'ausilio nella differenziazione tra lesioni iperplastiche e neoplastiche, purché valutata solo nell'ambito delle cellule B. In particolare, lesioni con più del 28% di linfociti B e con una frazione di crescita superiore al 3% sono con maggiore probabilità di tipo neoplastico.

**Tabella 1.4.** Distribuzioni delle variabili cliniche e patologiche a seconda della diagnosi in 35 casi di lesioni linfoidi nodulari spleniche canine.

 Fonte: **Sabattini S, Lopparelli RM, Rigillo A, et al.** Canine splenic nodular lymphoid lesions: immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment. *Vet Pathol.* 2018; 55:645-653.

<i>Variabile</i>	<i>Linfomi nodulari (n = 15)</i>	<i>Iperplasia nodulare (n = 20)</i>	<i>P</i>
<i>Ratio maschio/femmina</i>	1:0,9	1:1	.84
<i>Età (anni)<sup>a</sup></i>	9,2 ± 2,2	9,8 ± 3,2	.59
<i>Peso corporeo (Kg)</i>	14,2 ± 8,9	20,4 ± 11,6	.093
<i>Presenza di segni clinici</i>	8 (53%)	2 (10%)	.008*
<i>Massa addominale<sup>b</sup></i>	5 (33%)	2 (10%)	.19
<i>Noduli splenici multipli</i>	3 (20%)	8 (40%)	.28
<i>Splenomegalia diffusa</i>	3 (20%)	7 (35%)	.45
<i>Diametro del nodulo (cm)<sup>a</sup></i>	3,4 ± 1,8 cm	1,8 ± 0,9 cm	.002*
<i>Massa rotta</i>	2 (13,3%)	0 (0%)	.17
<i>Anomalie ematologiche</i>	6 (40%)	3 (15%)	.13
<i>Aree CD79-a positive<sup>c</sup></i>	36,3 ± 10,6%	22,1 ± 10,7%	.0004*
<i>Aree CD3 positive<sup>d</sup></i>	14,8 ± 7,3%	13,4 ± 7,2%	.58*
<i>Ki-67 index, cellule B</i>	5,5% (3,3-6,2%)	2,1% (1,2- 3,1%)	.001*
<i>Ki-67 index, cellule non B<sup>d</sup></i>	30% (12,4-41,7%)	18% (9,8- 23,4%)	.13
<i>Sopravvivenza mediana (giorni)<sup>e</sup></i>	1216 (921-1511)	1302 (1231- 1373)	.85

\*P&lt;0.05

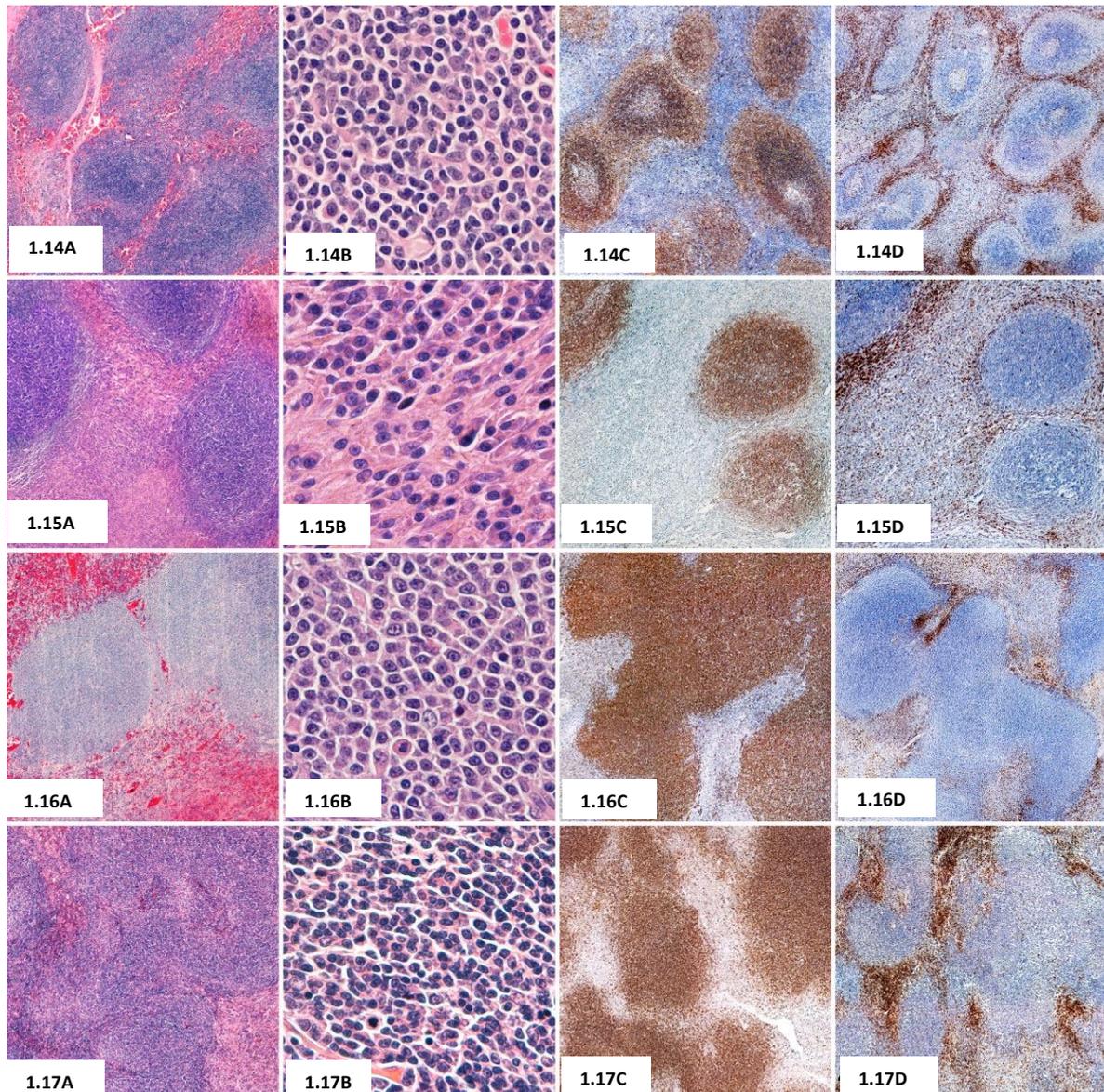
<sup>a</sup>Media ± deviazione standard

<sup>b</sup>Masse addominali rilevate all'esame fisico

<sup>c</sup>Percentuale dell'area tissutale occupata da cellule CD79a- o CD3 positive.

<sup>d</sup>Percentuale mediana (range interquartile)

<sup>e</sup>Mediana (intervallo di confidenza 95%)



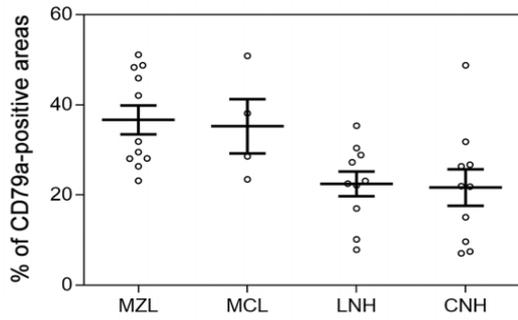
**Figura 1.14.** Iperplasia nodulare linfoide, milza, cane. Le strutture follicolari sono da isolate a confluenti, composte sia da piccoli che da medi linfociti B con un alone periferico di linfociti T che circondano i follicoli; (A, B) EE, (C) immunohistochimica (IHC) per CD79a, (D) IHC per CD3.

**Figura 1.15.** Iperplasia nodulare complessa, milza, cane. Le strutture follicolari sono separate da setti stromali composti da fibre collagene e fibroblasti frammentati a istiociti, plasmacellule e linfociti. (A, B) EE, (C) immunohistochimica (IHC) per CD79a, (D) IHC per CD3.

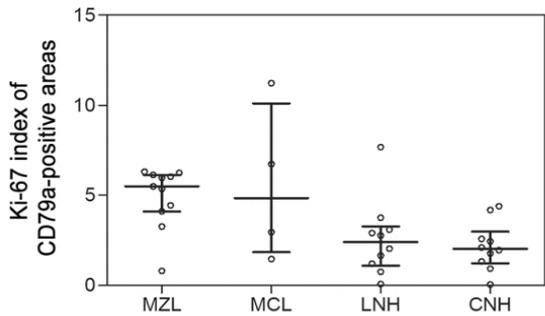
**Figura 1.16.** Linfoma della zona marginale, milza, cane. I follicoli sono irregolari e confluenti, composti prevalentemente da medi linfociti B con una moderata quantità di citoplasma e un nucleolo ben visibile; scomparsa di linfociti T tra i follicoli. (A, B) EE, (C) immunohistochimica (IHC) per CD79a, (D) IHC per CD3.

**Figura 1.17.** Linfoma mantellare, milza, cane. I follicoli sono irregolari e confluenti, composti prevalentemente da piccoli linfociti B con scarsa quantità di citoplasma e nuclei ipercromatici senza nucleoli visibili. Nonostante ci sia perdita dei linfociti T nelle zone interfollicolari, questi sembrano globalmente aumentati nella sezione, insieme alla reazione stromale. I follicoli sono irregolari e confluenti, composti prevalentemente da linfociti di piccole dimensioni e con nucleo con cromatina condensata. (A, B) EE, (C) immunohistochimica (IHC) per CD79a, (D) IHC per CD3.

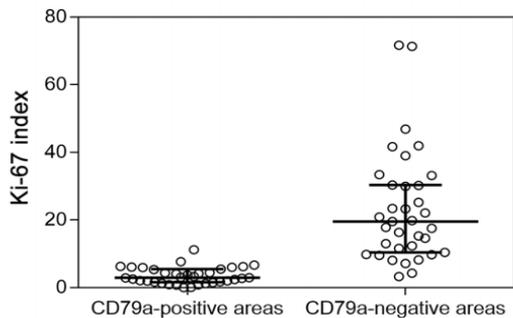
Fonte: **Sabattini S, Lopparelli RM, Rigillo A, et al.** Canine splenic nodular lymphoid lesions: immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment. *Vet Pathol.* 2018; 55:645-653.



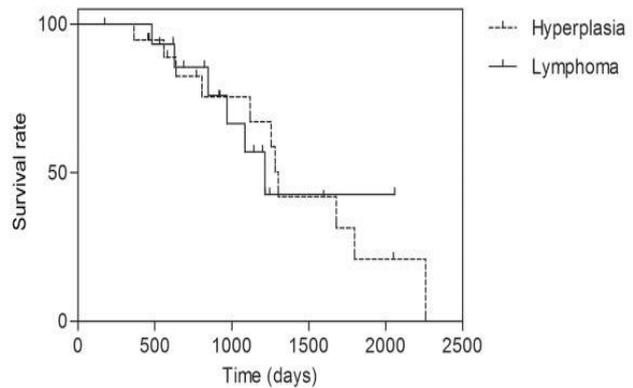
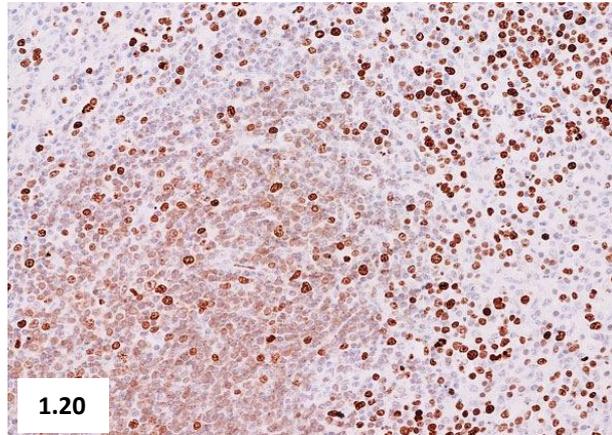
1.18



1.19



1.20



1.22

**Figura 1.18.** Percentuale delle aree positive al CD79a in 35 casi di lesioni linfoidi nodulari spleniche di cane. Il valore era significativamente più alto nei casi diagnosticati come linfomi nodulari (media,  $36,3 \pm 10,6\%$ ) rispetto alle iperplasie (media  $22,1 \pm 10,7\%$ ;  $P < .001$ ). MZL, linfoma della zona marginale; MCL, linfoma mantellare; LNH, iperplasia nodulare linfoide; CNH, iperplasia nodulare complessa.

**Figura 1.19.** Ki-67 index delle aree positive al CD79a in 35 casi di lesioni linfoidi nodulari spleniche. Il Ki-67 index era significativamente più elevato nei casi classificati come linfomi nodulare (mediana, 5,5, %; IQR, 3,3-6,2%) rispetto alle iperplasie nodulari (mediana 2,1%; IQR, 1,2-3,1%;  $P = .001$ ).

**Figura 1.20.** Ki-67 index in 35 casi di lesioni linfoidi nodulari spleniche. La media del Ki-67 index delle aree negative al CD79a era significativamente più elevata di quelle positive al CD79a ( $P < .001$ ).

**Figura 1.21.** Iperplasia nodulare complessa, milza, cane. CD79a/Ki-67 doppia immunocolorazione. L'attività proliferativa nell'area follicolare (CD79a positive) è minore dell'area esterna (CD79a negative). IHC per CD79a e Ki-67.

**Figura 1.22.** Curve di sopravvivenza di 35 cani con lesioni linfoidi nodulari spleniche. La sopravvivenza complessiva era 3,5 anni, senza differenze significative nell'outcome tra i linfomi nodulari (1216 giorni; 95% CI, 921-1511) e iperplasia (1302 giorni; 95% CI, 1231-1373;  $P = .849$ ). Tutte le morti sono state registrate come eventi.

*NOTICE: this is the definitive version of a work titled: "Canine splenic nodular lymphoid lesions: immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment" by Sabattini S, Lopparelli RM, Rigillo A, Giantin M, Renzi A, Matteo C, Capitani O, Dacasto M, Mengoli M, Bettini G. published on the journal "Veterinary Pathology", 2018; vol. 55 pg. 645-653.*

*Parte II*

**La citofluorimetria a flusso**

## Capitolo III

### La citofluorimetria a flusso in oncologia veterinaria

La citofluorimetria a flusso (CF) è una tecnica utile per la valutazione qualitativa e quantitativa di parametri multipli di cellule singole o di particelle in una sospensione cellulare complessa. Questa tecnologia è oggi parte integrante della ricerca nelle scienze biologiche (in particolare nell'immunologia), ed un elemento comune nelle indagini diagnostiche e prognostiche in oncologia umana (in maniera specifica nell'oncoematologia) (Nguyen *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2010). La CF è stata via via inserita anche nei campi dell'immunologia ed oncologia veterinarie con obiettivi simili.

#### 3.1 La tecnologia citofluorimetrica

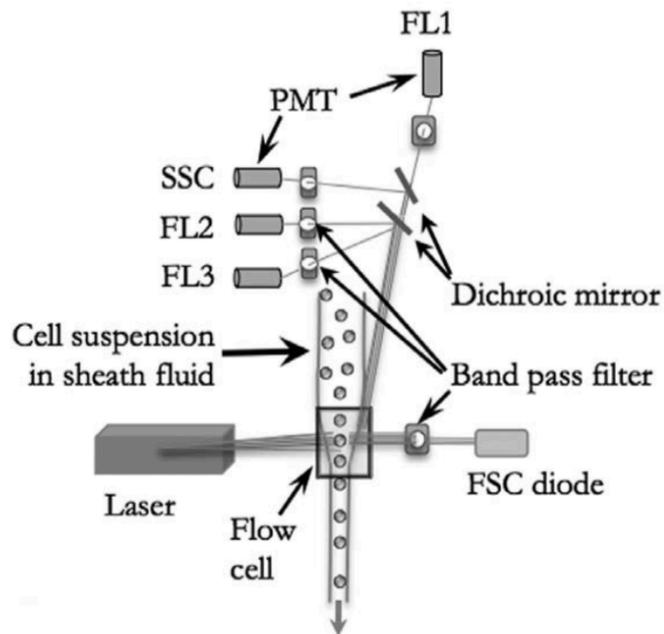
I citofluorimetri sono in grado di catturare le emissioni di luce o le proprietà di dispersione della luce (*light scatter*) di cellule monodisperse che sono fluorescenti in maniera innata o che vengono marcate con anticorpi o sonde fluorescenti, e che vengono poi esposti ad una fonte luminosa (Shapiro *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2007). I principi di base di un citofluorimetro sono che: (1) cellule o particelle disposte in fila singola e posti in un medium fluido vengono esaminate da una fonte di luce, che sia essa prodotta da una lampada ad arco o da uno o più laser di una determinata lunghezza d'onda e che (2) la dispersione di luce e la sua emissione vengono catturate dallo strumento. Per questo motivo, i campioni idonei all'analisi citofluorimetrica devono essere in stato liquido (sangue, midollo osseo, o liquidi corporei) oppure devono essere trasformate da uno stato solido ad una sospensione cellulare tramite processi di digestione enzimatica (proteasi) della matrice extracellulare o rottura

fisico/chimica dell'adesione cellulare mediante tritura, filtrazione o chelazione. La sospensione cellulare del test viene a questo punto iniettata in un sistema fluidico che comprende il medium di supporto che trasporterà le cellule lungo il citometro (Fig. 2.1). Il sistema fluidico circola sotto pressione ed è in genere costituito da un buffer salino idoneo alle cellule di mammifero; le cellule si uniscono al buffer nella camera di flusso, e, grazie ad un sistema di meccanica fluida che consente di ottenere un flusso laminare, vengono disposte nella parte centrale del flusso stesso, allineate in singola fila, equidistanti e quindi illuminate in maniera uniforme una volta che verranno esposte al fascio luminoso. I fattori fisici che influenzano questo processo sono la dimensione, l'orientamento e la concentrazione di cellule o particelle; la larghezza dell'orifizio del flusso di cellule; la velocità del campione e del buffer medium, il diametro del centro del flusso in movimento contenente le cellule relativamente a quello del buffer, e molti altri. Le cellule che vengono illuminate nel punto di analisi disperderanno la luce o, se marcate con sonde fluorescenti, emetteranno luce a specifiche lunghezze d'onda. Questi segnali ottici vengono catturati da fotorivelatori e convertiti da fotoni ad impulsi elettrici attraverso fotodiodi (che hanno una limitata amplificazione di segnale) o tubi fotomoltiplicatori, che aumentano l'output di elettroni per fotone (Fig. 2.1). Il primo fotodiodo che cattura il *forward scatter* ad angolo ristretto (FSC, di solito a  $0,5^\circ$ ) si colloca nel percorso del fascio di luce ed è parzialmente oscurato da una striscetta metallica per poter catturare solamente la luce che è stata rifratta con un'angolazione ridotta (Fig. 2.2). Per questo motivo il FSC riporta non solo la dimensione della cellula, ma anche il suo indice di rifrazione e proprietà di membrana. Il fascio luminoso è ulteriormente suddiviso verso altri fotorivelatori attraverso specchi diecrici che riflettono e trasmettono parzialmente la luce (Fig. 2.1). Un fotorivelatore è posizionato in modo da catturare la luce rifratta dalle cellule con

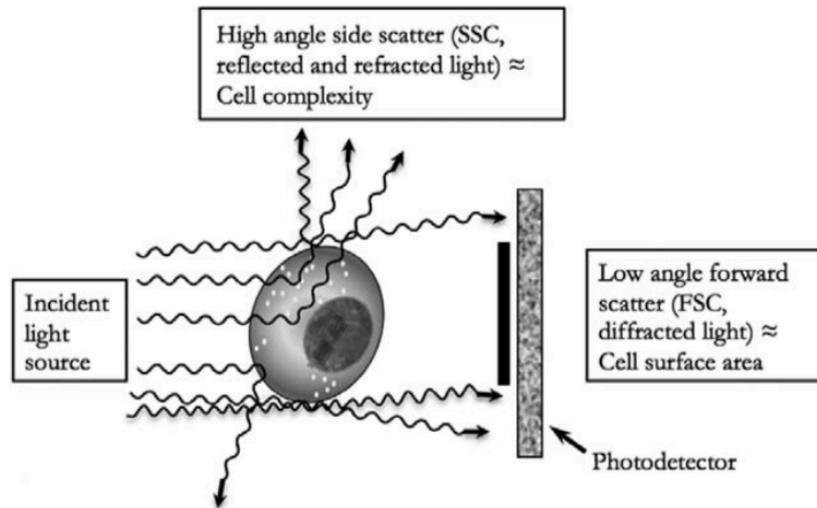
un'angolazione elevata (in genere 90°), e viene definito *side scatter* (SSC) o *orthogonal scatter* (Fig. 2.2). Il SSC è proporzionale alla complessità interna ed alla texture di superficie della cellula, come viene dimostrato, ad esempio, dal SSC più alto dei granulociti rispetto a quello dei linfociti (Fig.2.3). Ulteriori fotorivelatori vengono forniti di filtri che catturino specifiche lunghezze d'onda, come l'emissione della luce verde e giallo-arancio, che vengono misurate convenzionalmente da alcuni citometri come fluorescenza 1 e 2 rispettivamente. I fluorocromi comunemente usati, come l'*isotiocianato di fluoresceina* (FITC) e la *ficoeritrina* (PE), assorbono la luce a lunghezze d'onda di 488 nm e la emettono a circa 500 e 575 nm rispettivamente, e possono essere catturate individualmente attraverso appropriati filtri (Tabella 2.1). Tuttavia, molta della luce catturata ad una lunghezza d'onda di ampiezza ridotta è relativamente debole ed è quindi necessaria un'amplificazione attraverso tubi fotomoltiplicatori per generare un segnale elettrico utile (Longobardi, 2001).

I segnali elettrici generati dai fotoni sono sia catturati su scala lineare come accade per il FSC ed il SSC, sia amplificati su scala logaritmica. I segnali sono proporzionali all'intensità di luce, e convertiti da analogico a digitale per poter assegnare un valore di intensità. L'analisi del segnale è multifattoriale; questo dipende da fattori quali il tipo di amplificazione del segnale ed il numero di canali in cui l'intensità della luce viene divisa. Nonostante venga espressa una lettura numerica dei valori di intensità di luce, in molte circostanze i valori sono relativi e dipendono da parametri settati dall'operatore, e quindi non comparabili tra diversi strumenti ed esperimenti (Shapiro *et al.*, 2003). I citofluorimetri con capacità di cernita cellulare (*sorting*) consentono la segregazione di cellule singole con diverse rifrazioni di luce e proprietà di fluorescenza a partire da preparati cellulari complessi. Con i dovuti controlli di temperatura ed aerosol, le cellule segregate possono essere mantenute vitali e sterili per seguenti culture

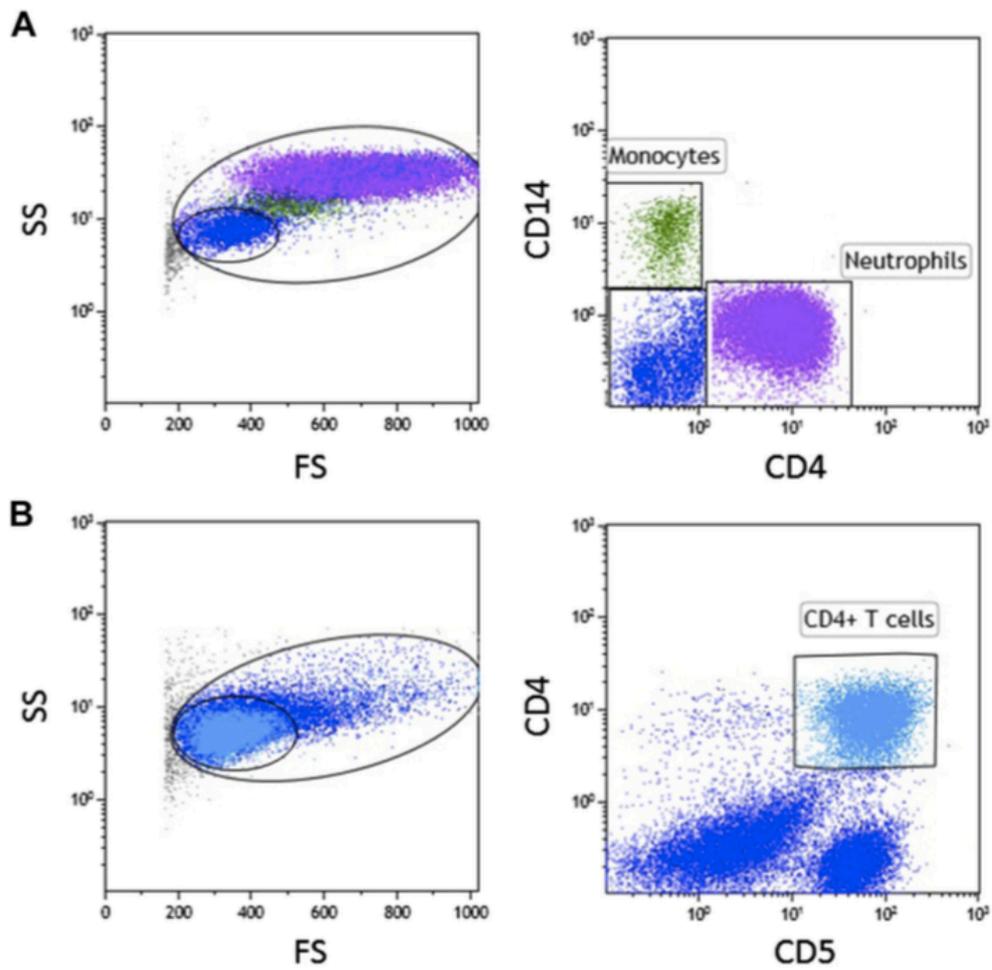
cellulari, estrazioni di RNA o, in caso di materiale spermatico, fertilizzazioni (Sharpe *et al.*, 2009).



**Figura 2.1.** Componenti di base di un citofluorimetro. Le cellule in sospensione vengono concentrate in un flusso laminare e investigate singolarmente da diversi fasci laser. Le proprietà di light scatter delle cellule vengono raccolte dal *forward scatter* ad angolo chiuso (FSC) e dal *side scatter* ad angolo aperto (SSC). Il filtro passabanda trasmette a luce ad una determinata lunghezza d'onda, mentre gli specchi dicroici rifrangono la luce a seconda delle lunghezze d'onda. I diodi convertono la luce catturata (fotoni) in segnale elettrico (elettroni), mentre i tubi fotomoltiplicatori (PMT) amplificano i segnali luminosi deboli durante la conversione. I fotoni emessi dai fluorocromi sono rilevati a specifiche lunghezze d'onda (FL, fluorescence. 1, 2, 3). Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology.* *Vet Pathol.* 2011; 48:223-235.



**Figura 2.2.** La luce rilevata con una angolazione chiusa dal forward scatter (circa  $0.5^\circ$ ) è proporzionale all'area della sezione trasversale della cellula e al suo indice di rifrazione, e per questo motivo è correlata al volume cellulare. Il light scatter ad angolo aperto (side scatter, minimo  $90^\circ$ ) riflette la complessità interna e la texture di superficie della cellula, come ad esempio i granulociti che hanno un side scatter maggiore di quello dei linfociti. Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology.* *Vet Pathol.* 2011;



**Figura 2.3.** Caratteristiche citofluorimetriche del sangue periferico (A) e di aspirato linfonodale (B) di cane. Nel sangue periferico, i neutrofili sono più grandi e con citoplasma granuloso, come indicato dal fsc e SSC (CD14+/CD4+; in color *violetto*). I monociti sono lievemente più piccoli con una minore complessità citoplasmatica (CD14+/CD4-; in color *verde*), mentre i linfociti sono di piccole dimensioni e con bassa complessità citoplasmatica (in *blu*) e delineate dal cerchio (*gate*) nero minore. Nell'aspirato linfonodale, i grandi linfociti hanno proprietà di SSC e FSC simili a quelli dei monociti. Il gate minore identifica i piccoli linfociti, di cui i CD4+ sono in *azzurro*.  
 Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol.* 2011; 48:223-235.

### 3.2 Preparazione delle cellule

Tra le cellule idonee alla citofluorimetria ci sono quelle ematiche, quelle di liquidi corporei, e quelle da tessuti solidi che possono essere processate a sospensione cellulare. Come per gli altri campioni, la qualità preanalitica del campione può influenzare in maniera importante la qualità dei dati generati durante l'analisi citofluorimetrica (Comazzi *et al.*, 2018; Martini *et al.*, 2018). I campioni devono avere una quantità sufficiente di cellule, non devono contenere coaguli e contaminanti, e devono essere maneggiati in modo da massimizzare la vitalità e minimizzare gli artefatti. Per preservare l'integrità cellulare e l'espressione antigenica, i campioni per la CF devono essere freschi; generalmente vengono considerate 48 ore come tempo massimo di stoccaggio affinché siano mantenute una vitalità ed un'espressione antigenica adeguate (Nguyen *et al.*, 2007; Mustafa *et al.*, 2008; McKenna *et al.*, 2009; McCoy *et al.*, 2010). La vitalità cellulare può essere prolungata preservando le cellule in medium di cultura freddi o in buffer contenenti EDTA ed una fonte proteica come il siero o il plasma fetale bovino (Gibson *et al.*, 2004). Diversi metodi sono stati descritti per la preservazione delle caratteristiche citologiche dei leucociti di cane fino alle 48 ore, ma la loro validità per la preservazione antigenica non è ancora del tutto determinata (Bienzle *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2004; Fry *et al.*, 2006). I campioni che derivano da tessuti neoplastici con un elevato turnover delle cellule, come alcuni tipi di linfoma, potrebbero essere più prone alla disintegrazione prima delle 48 ore e dovrebbero essere analizzate entro le 24 ore dalla raccolta. Se le cellule per l'analisi CF derivano, invece, da tessuti solidi dovrebbero essere contestualmente preparati cytopspin, vetrino citologico, oppure sezioni di tessuto per le analisi istopatologica od immunoistochimica, per poter correlare i risultati della citofluorimetria con quelli microscopici.

Seppur la dimensione e le caratteristiche di dispersione della luce degli eritrociti siano diverse da quelle dei leucociti, è comunque necessario rimuovere i globuli rossi prima dell'analisi, poiché questi superano di 1000 volte in quantità i leucociti a livello ematico. La lisi osmotica dei globuli rossi con acqua, cloruro di ammonio, o altri buffer è preferibile a quelle che utilizzano metodi di gradiente di densità per preservare l'integrità leucocitaria (Nguyen *et al.*, 2007). I metodi di centrifugazione per densità concentrano selettivamente i leucociti con una determinata densità di galleggiamento, ma escludono alcuni leucociti normali, anormali o immaturi (Mustafa *et al.*, 2008). Il sangue raccolto in EDTA è ideale per la CF, in quanto idoneo per la successiva lisi dei globuli rossi, analisi CF e concomitanti analisi ematologiche. Anche il sangue di specie aviari o rettili è idoneo se raccolto in eparina, ma è comunque necessaria la rimozione dei globuli rossi nucleati tramite centrifugazione per gradiente (Kapczynski *et al.*, 2008). Altri campioni quali liquido cerebrospinale, versamenti, e aspirati linfonodali o di altri tessuti e messi in soluzioni buffer possono essere processati con una minima preparazione delle cellule (Duque *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2004). Tuttavia, la cellularità del campione andrebbe sempre verificata mediante conta manuale o automatica, o quantomeno stimata sulla base del metodo di raccolta scelto, tenendo conto, ad esempio, della dimensione dell'ago e del numero di aspirati raccolti.

Recenti studi hanno valutato retrospettivamente le variabili preanalitiche delle analisi citofluorimetriche di linfomi di cane e gatto, identificando come fattore determinante la cellularità del campione, spesso legata alla dimensione dell'ago utilizzato (che idealmente dovrebbe essere di 21 G), seguita da altri fattori legati all'operatore (ed in particolare la manualità del veterinario inviante), alla natura del campione e artefatti come ad esempio l'emodiluzione del campione e la necrosi cellulare. Nessuna variabile legata al segnalamento

dell'animale è risultata, al contrario di quanto ipotizzabile, significativamente associata ad inadeguatezza del campione (Comazzi *et al.*, 2018; Martini *et al.*, 2018)

### 3.3 La marcatura anticorpale e la scelta dello strumento

Una volta raccolto un campione che contenga una quantità sufficiente di cellule vitali, questo andrebbe immediatamente processato per essere marcato con anticorpi, o direttamente analizzato per la valutazione del DNA. Come prima fase, le cellule sono solitamente lavate o incubate con un buffer contenente siero, per bloccare legami aspecifici degli anticorpi coi siti di legame cellulari. La soluzione di blocking può contenere siero della stessa specie le cui cellule vengono analizzate, ma per motivi economici sono maggiormente diffusi quelli contenenti siero bovino od equino. Il blocco dei legami aspecifici è particolarmente importante per i protocolli di marcatura anticorpale indiretti; in questo caso, invece, risulta ideale il siero della stessa specie utilizzata negli anticorpi secondari. Le cellule devono poi essere divise in aliquote per i controlli positivi e negativi, e per la marcatura con i reagenti sperimentali. Il campione controllo negativo dovrebbe essere costituito da cellule non marcate, cellule marcate solamente con anticorpo secondario coniugato al fluorocromo, o cellule marcate con anticorpo fluorescente diretto su un epitopo non espresso dalla popolazione cellulare esaminata (controlli isotipo). I controlli positivi dovrebbero includere un uso appropriato della diluizione nota di un anticorpo a legare almeno alcune delle cellule nel campione analizzato. Il tipo di controllo positivo e negativo, e se siano necessari altri controlli aggiuntivi, dipendono dal tipo di cellule, dagli isotipi anticorpali, dal numero di combinazioni anticorpo/fluorocromo, dal saggio citometrico (ad esempio se è già stato convalidato ed ottimizzato o se viene effettuato per la prima volta), e dalle preferenze dell'operatore. La CF

è incline a segnali falsi che possono risultare dall'autofluorescenza delle cellule, dalla mancanza della titolazione anticorpale, da legami anticorpali non specifici, dall'interazione tra i diversi fluorocromi, dall'assenza di ottimizzazione dello strumento e da molti altri fattori (Hurley, 2010). Esiste un considerevole potenziale per segnali errati e artefatti nell'analisi citofluorimetrica, che sottolinea l'importanza di assicurare prestazioni di qualità dello strumento, l'utilizzo di campioni e reagenti di controllo appropriati, ed un controllo periodico dei risultati tramite metodi alternativi. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri protocolli per la calibrazione degli strumenti ed il controllo della qualità (Shapiro, 2003; Perfetto et al, 2006; Chattopadhyay *et al.*, 2008). Anche con esperimenti relativamente semplici ad uno o due colori è spesso necessario verificare che il segnale rilevato dal citometro corrisponda ad una interazione antigene-anticorpo o substrato-ligando nella posizione cellulare corretta. Un metodo utile e comunemente usato nei campioni sperimentali è l'esame di preparati cytospin mediante microscopia a fluorescenza o immunocitochimica.

L'incubazione degli anticorpi viene in genere effettuata a 4°C per 15-30 minuti per minimizzare il capping dell'RNA e le mutazioni antigeniche. Come in tutti gli esperimenti con anticorpi, la loro concentrazione ottimale deve essere determinata mediante titolazione, o in caso di combinazioni di anticorpi, questi devono essere ottimizzati insieme. Gli anticorpi possono essere direttamente coniugati ai fluorocromi (*marcatura diretta*), il che riduce i passaggi di incubazione e i potenziali legami non specifici, oppure possono essere utilizzati in una procedura a due passaggi (*marcatura indiretta*), con l'applicazione sequenziale dell'anticorpo primario, rimozione degli anticorpi non legati, e applicazione di un anticorpo secondario fluorescente. In medicina veterinaria, la scelta di quale formato di anticorpi utilizzare è spesso limitata dalla disponibilità di anticorpi coniugati presenti in commercio.

L'immunofenotipizzazione delle cellule emolinfatiche prevede l'utilizzo di un pannello di anticorpi diretti sulla superficie cellulare o su antigeni del cluster di differenziazione (CD) per caratterizzare cellule che appaiono microscopicamente simili (Stewart and Stewart, 2010).

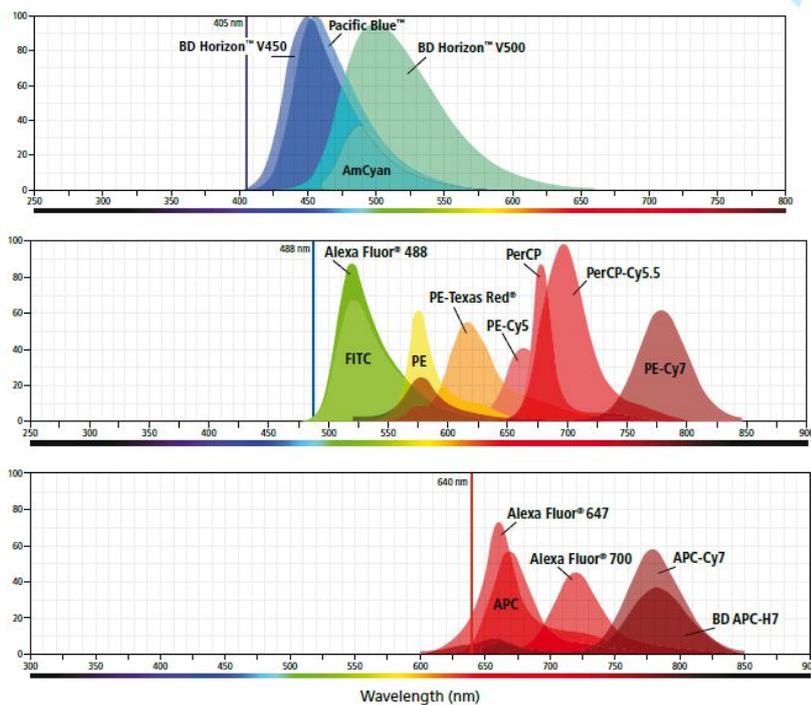
Le marcature di antigeni intracellulari vengono spesso effettuate per indagare citochine o antigeni citoplasmatici, ma la tecnica risulta più laboriosa e più suscettibile ad artefatti (Sachdeva *et al.*, 2007). Per consentire agli anticorpi di raggiungere gli antigeni intracellulari, le cellule devono essere fissate e permeabilizzate. La fissazione con derivati della formaldeide cambia il riconoscimento degli epitopi da parte degli anticorpi, altera le proprietà di *light scatter* della cellula ed aumenta il legame degli anticorpi a cellule non target o non vitali (Longobardi, 2001). Per questo motivo dovrebbero essere forniti ulteriori controlli negativi e positivi, ed è necessaria la verifica dell'origine cellulare del segnale fluorescente. Gli anticorpi coniugati sono gli unici idonei alla marcatura degli antigeni intranucleari, che può avvenire dopo aver effettuato quella degli antigeni di superficie (sia in maniera diretta che indiretta) seguita dalla fissazione e permeabilizzazione delle cellule.

I fluorocromi comunemente in uso nei laboratori di diagnostica sono quelli eccitabili ad una lunghezza di 488 nm, che coincide con l'emissione del laser ad Argon nel primo citofluorimetro da banco di maggiore diffusione, il FACScan della Becton Dickinson. Questo strumento è dotato di 3 filtri a lunghezze d'onda fisse (530, 575 e 675 nm) idonei a catturare le emissioni dei fluorocromi *FITC*, *Alexa Fluor 488*, *PE*, il complesso peridrina-clorofilla-proteina (*PerCP*) ed altri coloranti (Tabella 2.1; Fig. 2.4). *FITC* e *PE* rimangono i fluorocromi di più ampio uso, ma sono disponibili molti altri coloranti eccitabili a 488 nm, e con una fotostabilità anche maggiore, come ad esempio i più recenti *quantum dot nanocrystals* (Qdot, Invitrogen), che sono particelle nanometriche semiconduttrici con una emissione di luce e stabilità

nettamente superiori a quelle dei fluorocromi convenzionali. Tuttavia, stanno diventando sempre più disponibili citometri equipaggiati di ulteriori laser e filtri, e con ciò anche la disponibilità di fluorocromi è diventata più ampia. Oltre che dall'hardware del citometro, la scelta dei fluorocromi dipende soprattutto dalla disponibilità dell'antigene ricercato (PE fornisce un segnale, per singola molecola, più luminoso rispetto a quello di FITC), dalla differenza delle lunghezze d'onda d'emissione (per ottenere segnali distinti), dalla natura e posizione degli antigeni che devono essere marcati (essendo, ad esempio, PE una molecola più grande di FITC, questa si muove meno agilmente attraverso la membrana permeabilizzata), e da altri fattori (Shapiro, 2003). La scelta del citofluorimetro per un laboratorio dipende dalla natura degli esperimenti proposti e dai test diagnostici, dal numero di fluorocromi che devono essere utilizzati simultaneamente in un esperimento, dalle lunghezze d'onda dei laser dello strumento, dalla manovrabilità della rilevazione e processazione del segnale, dalle competenze degli operatori e dai fondi economici disponibili. Citofluorimetri piccoli e automatizzati stanno pian piano diffondendosi a costi accessibili, consentendo quindi a molti laboratori di inserire questa pratica nel repertorio di test diagnostici offerti.

**Tabella 2.1.** Fluorocromi comunemente utilizzati nei citofluorimetri dotati di un laser 488 nm.

Fluorocromo	Lunghezze d'onda di rilevazione		
	530 nm (Fluorescenza 1)	575 nm (Fluorescenza 2)	675 nm (Fluorescenza 3)
Isotiocianato di Fluoresceina (FITC)	X		
Alexa Fluor 488	X		
Ficoeritrina (PE)		X	
Ioduro di Propidio (PI)			X
Proteina peridrina-clorofilla (PerCP)			X
Ficoeritrina-Texas red			X
Ficoeritrina-Cy5			X
Ficoeritrina-Cy7			X



**Figura 2.4.** Spettri di eccitazione ed emissione dei fluorocromi più comunemente usati ed indagati con laser violetto (in alto), blu (al centro) e rosso (in basso). Fonte: *BD Multicolor Fluorochrome Reference Chart*. Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol.* 2011; 48:223-235.

### 3.4 Analisi di DNA ed RNA

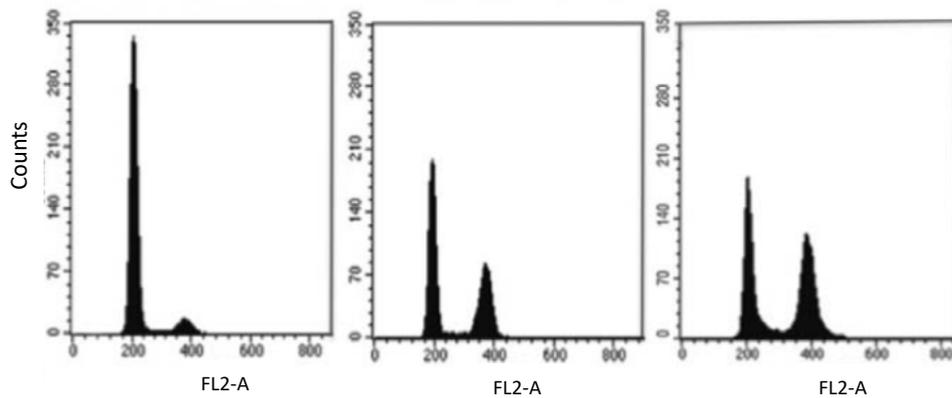
Oltre a rilevare proteine con sonde fluorescenti e anticorpi, il CF misura e caratterizza il DNA e l'RNA. L'analisi citofluorimetrica degli acidi nucleici è utilizzata per caratterizzare la sintesi di DNA o RNA, gli stadi del ciclo cellulare, l'apoptosi, la necrosi e i singoli cromosomi. In oncologia, l'analisi del DNA può servire in aggiunta alla stima della frazione di proliferazione tumorale o dello stato di aneuploidia, che può essere correlato alla prognosi tumorale. Rispetto ai fluorocromi legati agli anticorpi, i coloranti per gli acidi nucleici emettono fluorescenza in maniera significativa solo quando sono legati al loro target; per questo motivo, il lavaggio dal colorante eccessivo non è necessario prima delle analisi al citofluorimetro. Sono disponibili diverse colorazioni per gli acidi nucleici, la cui scelta ricade in base alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione, la compatibilità con l'hardware del citometro, la penetrazione nella membrana cellulare e la specificità del nucleotide. Ad esempio, lo *ioduro di propidio* (*propidium iodide, PI*) ed alcuni coloranti monomerici cianini, come il YO-PRO e il TO-PRO, sono esclusi dalle cellule vitali e vengono eccitati dai laser Argon 488 nm, ma legano sia il doppio filamento di DNA che l'RNA, rendendo quindi necessario l'utilizzo di RNasi se si volesse esaminare solo il DNA. Grazie alla compatibilità con i laser Argon, il PI è la colorazione per acidi nucleici più utilizzata, e la sua esclusione dalle cellule vitali consente di discriminare tra necrosi ed apoptosi precoce (Smolewski *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2007). Anche l'*arancio acridine* è eccitabile a 488 nm, è in grado di permeare le cellule, ed emette una fluorescenza rossa se si lega ad acidi nucleici lineari (RNA o DNA denaturato), od una fluorescenza verde se si lega al DNA ad elica (Huang *et al.*, 2005). Per questo motivo, l'arancio acridina può essere utilizzato per indagare la relazione tra il contenuto di RNA e il ciclo cellulare o la degradazione del DNA. I coloranti *Hoechst* e *cromomicina A3* sono eccitabili dai laser ultravioletti e si legano

preferibilmente ai siti nucleotidici AT (adenina-timina) e GC (guanina-citosina) rispettivamente, il che può risultare utile per identificare i geni caratterizzati da regioni ricche di queste combinazioni nucleotidiche. I coloranti non permeanti per gli acidi nucleici sono invece utili per l'esclusione delle cellule non vitali dalle analisi (Schmid *et al.*, 2007). Ad esempio, la *7-amino-actinomicina* è eccitabile dai laser 488 nm ed emette segnale a 655 nm, il che la distingue da FITC e PE; inoltre, può essere facilmente incorporata nella preparazione cellulare come indicatore dell'integrità delle cellule che vengono analizzate (Sharpe and Evans, 2009).

Le cellule di un organismo possiedono una grande quantità di DNA nucleare a meno che non vadano incontro a mitosi, meiosi o apoptosi. Questa quantità di DNA riflette lo stato diploide delle cellule somatiche (2C). Una popolazione cellulare che contiene nuclei con un'aumentata o diminuita quantità di DNA (aneuploide) si osserva comunemente nei tumori, e, in molti casi, riflette le caratteristiche di malignità del tumore (Fig 2.5). Più di 20 anni fa, Hedley stabilì la quantificazione citometrica del DNA in nuclei purificati da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (Hedley, 1989), che ha quindi reso possibile effettuare numerose correlazioni retrospettive con l'istopatologia, il trattamento e l'outcome di neoplasie presenti in archivio. Il coefficiente di variazione ottenuto dai picchi di DNA diploidi risulta essere un importante controllo della qualità per l'analisi citofluorimetrica del DNA. Poiché una quantità uniforme di DNA dovrebbe portare alla formazione di segnali fluorescenti ad essa coerenti, e quindi, picchi stretti, un ampio coefficiente di variazione può essere il risultato di degradazione nucleare, variazioni nel fascio di luce, colorazione del campione incorretta, un flusso scarso del campione, od una reale aneuploidia delle cellule con una quantità anormale di DNA. Per questo motivo è essenziale ottenere picchi stretti nei campioni controllo per l'identificazione

delle cellule con differenze sottili nella quantità di DNA (Fig 2.5). È inoltre essenziale ricordare che la fluorescenza rispecchia la quantità totale di DNA per nucleo, che è generalmente inalterata grazie a traslocazioni, inserzioni o delezioni. Biologicamente, quest'ultime modificazioni possono essere significative e identificabili mediante analisi citogenetica, ma a meno che il contenuto totale di DNA non subisca cambiamenti per più del 5% circa, questi non sono identificabili mediante CF.

Per l'analisi in vitro del ciclo cellulare è spesso richiesto quantificare la proporzione di cellule in ogni stato diploide (G0/G1) con un DNA 2C complementare, in fase S con una quantità intermedia di DNA, e in fase G2/M, dove la sintesi di DNA viene completata, con uno stadio tetraploide (4C) (Huang *et al.*, 2005). La determinazione citofluorimetrica della sintesi di DNA si correla misurando l'incorporazione di 3H-timidina radioattiva nel DNA di nuova sintesi, ma le informazioni trasmesse sono relative ad un campione controllo, non valori assoluti; inoltre, come con la maggioranza delle analisi citometriche, decidere dove un picco di istogramma finisca e cominci il successivo può influenzare soggettivamente ed in maniera importante i risultati. I nuclei con cromatina condensata analizzati in un citometro genereranno due o tre volte la fluorescenza di un nucleo singolo, fornendo così risultati erronei che devono essere esclusi grazie all'analisi iniziale di ampiezza e altezza per distinguere le cellule aggregate da quelle iperploidi. Una volta che l'analisi è focalizzata su cellule singole, diversi algoritmi di software possono essere applicati per stimare la proporzione di cellule in ogni fase e lo stato iperploide (Darzynkiewicz *et al.*, 2004). Le differenze nel contenuto di DNA tra le cellule del campione ed il corrispettivo tessuto controllo possono essere indicazione di acquisizione di alterazioni numeriche cromosomiali.



**Figura 2.5.** Cellule di cane marcate con propidio di ioduro e analizzate al citofluorimetro. *A sinistra:* tessuto splenico benigno con il 94% delle cellule contenente DNA diploide (picco 1) e il 6% con un contenuto approssimativamente tetraploie (picco 2). *Al centro:* sarcoma istiocitario splenico, con il 49% di nuclei diploidi (picco 1), il 5% di DNA in sintesi (area compresa tra picco 1 e 2), e 46% teraploide (picco 2). *A destra:* Linfoma linfoblastico T con il 43% di nuclei diploidi, l'8% di nuclei con DNA in sintesi, 44% di nuclei tetraploidi e 5% di nuclei con contenuto di DNA maggiore della tetraploidia.

Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol. 2011; 48:223-235.*

### 3.5 Analisi dei dati

Una volta che le cellule sono marcate con i fluorocromi, queste possono essere immediatamente sottoposti all'analisi citofluorimetrica da fresche, oppure essere conservate in formaldeide o altri fissativi a base di alcol per poter effettuare l'analisi in un momento diverso. Le cellule fissate hanno proprietà di scatter diverse ed una emissione del fluorocromo ridotta; per questo motivo, molti operatori preferiscono l'analisi del campione fresco (Shapiro, 2003; McCarthy *et al.*, 2008). Ciò che però ha rilevanza maggiore è, piuttosto che l'analisi del campione fresco o fissato, il fatto che il campione abbia una buona cellularità. Anche le cellule permeabilizzate per le marcature anticorpali intracellulari sono fissate, e quindi manifestano variazioni dello scatter rispetto a quelle non fissate.

In citofluorimetria a flusso vengono generalmente valutati due light scatter e almeno un parametro di fluorescenza in più di 10.000 cellule; per questo motivo, la gestione dei dati deve essere efficiente per poter massimizzare l'utilità di questa tecnologia. La maggior parte dei sistemi citometrici archiviano i dati in un formato standard, e tutte le informazioni riguardanti uno specifico campione sono poi utilizzabili da diversi software di analisi: se un campione venisse preparato per l'analisi con due fluorocromi e venisse analizzato un numero di 50.000 cellule, il data file conterrà numerosi valori per FSC, SSC e per ogni fluorocromo per ognuna delle 50.000 cellule analizzate. Ovviamente il volume di dati generato dal citofluorimetro è considerevole, ma la possibilità di avere il completo data set è importante per consentire la ripetizione delle analisi da parte di ricercatori o revisori dello studio. Tipicamente, i dati vengono inizialmente mostrati in un grafico bidimensionale (*plot*) FSC versus SCC sottoforma di punti, densità o profili. In campioni di sangue, in cui i globuli rossi sono stati lisati, questa configurazione consente la separazione dei linfociti, dei monociti, e dei granulociti in "nuvole"

distinte, in cui i monociti tipicamente rappresentano la popolazione cellulare meno omogenea. Selezionando le relative regioni di interesse (*gating*) è poi possibile effettuare analisi specifiche di una popolazione cellulare, come ad esempio la fluorescenza espressa dai linfociti. La natura fortemente visiva dell'interpretazione citofluorimetrica è particolarmente chiara quando si esaminano i citogrammi, poiché grazie alle diverse proprietà di *scatter* delle popolazioni cellulari, le caratteristiche di queste ultime sono già evidenti anche prima dell'analisi con fluorescenza. L'interpretazione delle fluorescenze può essere impostata ponendo la fluorescenza in un canale e il FSC o il SSC nell'altro, oppure relativamente ad un'altra fluorescenza, in base alla natura degli antigeni che si stanno esaminando (ad esempio l'analisi dell'espressione di diverse *lineage* leucocitari oppure un'analisi ristretta di un solo tipo di leucociti, come linfociti CD8+ in relazione a quelli esprimenti CD3). Gli istogrammi sono utili per valutare la distribuzione di un parametro per la sua indagine statistica.

La compensazione corregge le sovrapposizioni (*overlapping*) delle emissioni fluorescenti nei casi in cui la lunghezza d'onda di un fluorocromo "cada" oltre il filtro passabanda di un altro fluorocromo (Shapiro, 2003). Questa condizione è abbastanza frequente, anche con due soli fluorocromi, per cui la compensazione assume un'importanza via via maggiore in relazione all'aumentare del numero di fluorocromi esaminati (Tung *et al.*, 2004). Molti software di analisi, oggi, consentono l'aggiustamento dei parametri di compensazione anche dopo l'acquisizione del dato, ma nei vecchi citometri è importante impostare manualmente questi aggiustamenti prima dell'acquisizione stessa, per poter facilitare la seguente analisi dei dati. Un'adeguata compensazione è argomento di forti dibattiti tra i citometristi (Mahnke and Roeder, 2001), e da un punto di vista pratico, se solo due di tre fluorocromi venissero valutati, la compensazione starebbe nel preparare campioni per ciascun fluorocromo singolo, oppure

con fluorocromi multipli solo in quelle popolazioni esprimenti antigeni concomitanti (di nuovo, i linfociti CD4 e i CD8, per esempio).

L'analisi dei dati dei pannelli di routine che includono aliquote multiple con al massimo due fluorocromi concorrenti possono essere relativamente semplici, se l'espressione degli antigeni viene definita come *assente, debole o luminosa (absent, dim, bright)*. Ad esempio, i linfomi diffusi a grandi cellule del cane (DLBCL) sono tipicamente caratterizzati da grandi linfociti che non esprimono antigeni delle cellule T come CD3, CD4, CD8, T-cell receptor  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , fluorescenza debole per CD18, fluorescenza luminosa per CD21, per il complesso maggiore di istocompatibilità II (MHC II) ed altri (Gibson *et al.*, 2004). La quantificazione precisa dell'espressione antigenica delle cellule incentrata su parametri multipli, però, richiede un approccio analitico complesso. Recentemente sono stati indagati i limiti della presentazione lineare e logaritmica dei dati, per cui oggi sono disponibili visualizzatori bi-esponenziali dei dati che consentono la valutazione più precisa delle cellule presenti nelle aree a luminosità debole nella scala logaritmica (Herzenberg *et al.*, 2006). A causa di tutti i cambiamenti dell'analisi e della raccolta dei dati in citofluorimetria, è oggi comunemente richiesto che, per le pubblicazioni, vengano indicati il software e lo strumento usati, la scala per i dati presentati nei plots, la strategia o l'algoritmo di *gating*, la densità cellulare e come è stata determinata l'intensità di fluorescenza (Mahnke *et al.*, 2001).

### 3.6 Applicazioni in campo veterinario

Nella ricerca veterinaria, la misura della fluorescenza cellulare può trovare impiego per l'immunofenotipizzazione, l'analisi di ploidia, saggi di funzionalità cellulare o nella determinazione dell'efficienza di trasfezione con geni che codifichino per proteine fluorescenti (Bienzle *et al.*, 2003; Drummond and Allen, 2008; Lee *et al.*, 2008; Muppidi *et al.*, 2010). In oncologia, la CF trova applicazione soprattutto in ematopatologia, facilitata dal formato liquido dei campioni e dal fatto che esistano parametri numerici associati a stati patologici benigni e fisiologici. Sono stati compiuti numerosi sforzi tra il 2000 (Brayalan *et al.*, 2001) ed il 2006 (Wood *et al.*, 2007) per stabilire un consensus di immunofenotipizzazione delle neoplasie emolinfoidi nell'uomo, che consisteva in un pannello a 2-step, di cui il primo per la valutazione della *lineage* cellulare (linfociti B, linfociti T, cellule natural killer, cellule mielomonocitiche, plasmacellule) ed il secondo per una classificazione più precisa, con un numero di anticorpi che variava da 4 a 22 per pannello, sulla base della *lineage* cellulare investigata. Pannelli anticorpali così complessi sono pressoché proibitivi in medicina veterinaria per via dell'elevato costo e della limitata disponibilità di reagenti. Tuttavia, sia la generazione che la validazione di anticorpi monoclonali reattivi ad antigeni animali si stanno espandendo, così come la conoscenza dell'espressione dei marker CD specifici per ogni *lineage* cellulare (Tarrant *et al.*, 2005) ed il contenuto di DNA nei tumori animali (Culmsee *et al.*, 2002).

#### *Malattie Linfoproliferative*

Il linfoma è una patologia che viene in genere sospettata dai segni clinici e dai reperti laboratoristici, e confermata mediante esame citologico e/o istopatologico. La classificazione dei linfomi del cane è ancora controversa poiché alcuni schemi, tra cui quello del WHO (World

Health Organization) (Valli et al, 2002), sono basati su caratteristiche istopatologiche ed immunofenotipiche, mentre altri, come quello rivisitato di Kiel (Fournel-Fleury *et al.*, 1997) sono basati su aspetti citomorfologici. Una volta stabilita la diagnosi di linfoma, gli aspirati linfonodali o da altre masse possono essere posti in un buffer idoneo (generalmente una soluzione salina con piccole quantità di siero ed EDTA), marcati con gli anticorpi fluorescenti ed analizzati al citofluorimetro per classificare il tipo di linfoma (Fry et al, 2003; Gibson et al, 2004; Gelain et al, 2008). Bisogna enfatizzare, tuttavia, che l'analisi citofluorimetrica, allo stato attuale, non dovrebbe mai sostituire la diagnosi basata sulle caratteristiche citologiche o istopatologiche tumorali; la citofluorimetria a flusso dovrebbe, piuttosto, essere di supporto alla classificazione del tipo di linfoma.

#### ◆ *Valutazione della Lineage cellulare*

La valutazione della lineage cellulare T, B o NK è un passaggio chiave nella classificazione del sottotipo di linfoma, che può fornire informazioni importanti riguardo la prognosi e la risposta alla terapia (Comazzi *et al.*, 2011). La classificazione è basata sulla rilevazione di antigeni di superficie mediante marcatura singola, o tramite un ulteriore step di permeabilizzazione delle cellule per la marcatura di quelli intracellulari. In medicina umana, un antigene viene considerato espresso quando <20% delle cellule analizzate mediante *gating* sono positive per un determinato marker (Zeppa *et al.*, 2004); tuttavia, non esistono ancora delle linee guida simili attualmente in medicina veterinaria (Comazzi *et al.*, 2011).

Poiché la caratterizzazione immunofenotipica dei linfociti aspirati da una neoplasia preclude le informazioni architetturali del tessuto, dovrebbero essere esaminati solamente campioni che contengano un elevato numero di linfociti neoplastici. In altre parole, se il linfoma coinvolge solo pochi presunti linfociti neoplastici e sono presenti molti linfociti benigni, come

ad esempio accade nel *T-cell rich B-cell lymphoma* (Meyer *et al.*, 2006), la distinzione citofluorimetrica dei linfociti neoplastici e di quelli benigni sarebbe difficoltosa, se non impossibile. Gli anticorpi monoclonali per caratterizzare i linfociti nei piccoli animali sono relativamente numerosi (Blanchard-Channel *et al.*, 1994; Danilenko *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1992) (Tabella 2.2) e sono state descritte particolari neoplasie emolinfatice ricorrendo a pannelli contenenti fino a 32 anticorpi (Allison *et al.*, 2008; Ameri *et al.*, 2010). Tuttavia, molti di questi anticorpi sono in grado di riconoscere gli antigeni solo in campioni non fissati in formalina o in sezioni congelate. Studi citofluorimetrici sul linfoma canino hanno confermato la predominanza dei linfomi B ed identificato varianti dei linfomi a fenotipo T (Gelain *et al.*, 2008). Sono tuttavia presenti eccezioni rappresentate da predisposizioni di razza quale il Boxer (Lurie *et al.*, 2008), lo Shi-tzu e lo Spitz (e razze derivate) (Modiano *et al.*, 2005) dove è stata dimostrata (con IHC) una predominanza del fenotipo T piuttosto che B. Il linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) che corrisponde al sottotipo immunoblastico definito dai criteri del WHO (Valli, 2007; Valli *et al.*, 2011) è il linfoma a cellule B più comune nei cani, ed è caratterizzato dall'espressione degli antigeni di superficie CD21, CD1, CD45RA, CD90 e MHC II (Gibson *et al.*, 2004; Valli, 2007). I linfomi a cellule T del cane sono caratterizzati da un immunofenotipo più variabile e dall'espressione di diverse combinazioni degli antigeni T CD3, CD4, CD8 e  $\alpha\beta$ -TCR  $\gamma\delta$ -TCR; l'analisi del linfoma a cellule T del Boxer ha inoltre correlato l'immunofenotipo alle caratteristiche morfologiche (Lurie *et al.*, 2008).

L'ipercalcemia caratteristica del linfoma di origine T nel cane è spesso associata all'espressione degli antigeni CD4 e  $\alpha\beta$ -TCR. Il confronto citofluorimetrico tra linfociti benigni e maligni ha identificato una relativa downregulation del CD18 e del CD45 nelle cellule neoplastiche, limitandone potenzialmente il loro utilizzo come markers leucocitari universali (Comazzi *et al.*,

2006; Gelain *et al.*, 2008). Questo riscontro corrobora il fatto che la positività per il CD18 nei preparati fissati in formalina di tumori rotondocellulari sia suggestivo di neoplasia istiocitaria o granulocitaria piuttosto che linfocitaria.

Gli anticorpi che sono stati identificati come sensibili ai legami non specifici nelle cellule animali comprendono i cloni HM57, creati per un epitopo intracellulare della catena alfa del CD79 e ampiamente usato per l'identificazione dei linfociti B. Questo anticorpo ha grande valore per i campioni fissati in formalina in un vasto range di specie, ma è sensibile ai legami aspecifici con nuclei di cellule linfoidi e non. Queste interazioni aspecifiche possono avvenire nella citofluorimetria di preparazioni non fissate dove è evidente solamente un segnale fluorescente, ma non la fonte del segnale stesso (Fig.2.6); la caratterizzazione immunocitochimica di cellule che apparentemente coesprimono antigeni delle cellule T (CD3) e B (CD79 $\alpha$ ) è da considerarsi coerente con un'origine T ed un legame aspecifico dell'anticorpo HM57. Altri anticorpi specifici delle cellule B e reattivi con epitopi fissati in formalina in tessuto di cane sono quelli diretti contro CD20 (Jubala *et al.*, 2005), CD22 (Faldyna *et al.*, 2007), e Pax5 (Willmann *et al.*, 2009)., ma poiché i loro epitopi target sono localizzati a livello intracellulare, il loro utilizzo in CF deve essere effettuato con criticità. L'anticorpo monoclonale BLA.36 è stato generato contro antigeni espressi dalle cellule del linfoma di Hodgkin (Imam *et al.*, 1990), ed è stato applicato per la rilevazione delle cellule B in campioni animali, ma la reattività di questo anticorpo non è specifica per i linfociti B o T di cane o di cavallo (Mueller *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006). In citofluorimetria risultano più utili, per l'identificazione delle cellule B, gli anticorpi diretti contro epitopi di membrana, come il clone CA2.1D6.

I timomi lymphocyte-rich e i linfomi timici a piccole cellule possono essere citologicamente simili, ma richiedono terapie differenti; per la loro distinzione può quindi risultare utile la CF. Aspirati di masse mediastiniche che, all'esame citofluorimetrico, rivelino una presenza  $\geq 10\%$  di linfociti che coesprimono CD4 e CD8 sono stati correlati a diagnosi istologica di timoma, mentre i linfomi timici esprimono pattern antigenici più variabili tra cui solo CD4, solo CD8 o altri antigeni B (Lana *et al.*, 2006). In questo studio in particolare, che prevedeva una coorte modesta di casi, erano tuttavia presenti linfomi timici coesprimenti CD4 e CD8 ( $\leq 2\%$ ), per cui la valutazione di questi tumori dovrebbe essere sempre effettuata in associazione a quella morfologica (Fournel-Fleury, 1997).

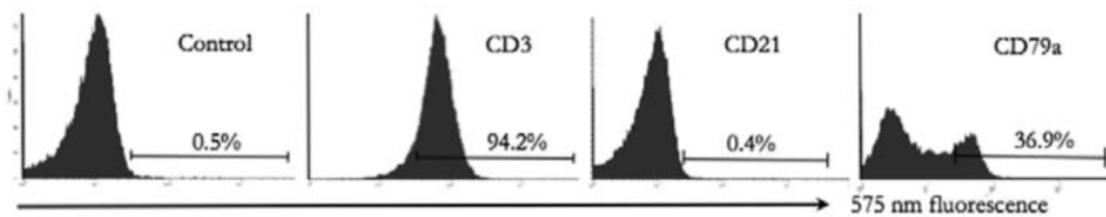
La CF ha però consentito di comprendere meglio il sito di origine di alcuni tipi di linfomi; ad esempio, nei gatti, i linfociti intraepiteliali intestinali benigni sono primariamente cellule T CD3+, con un'ampia proporzione di cellule esprimenti l'omodimero CD8 $\alpha\alpha$  piuttosto che l'eterodimero CD8 $\alpha\beta$ , che è invece più comune tra i linfociti circolanti ematici (Roccabianca *et al.*, 2006). Un'altra piccola proporzione di linfociti intraepiteliali è CD4+ e CD3+ o CD11d+ (Roccabianca *et al.*, 2000). La morfologia del linfoma intestinale a grandi linfociti granulari (large granular lymphocytes lymphoma, LGL) del gatto è un'entità citologica distinta con cellule neoplastiche circolanti frequenti ed una scarsa prognosi (Roccabianca *et al.*, 2000). Molti di questi linfomi di origine intestinale di tipo LGL esprimono CD3 e l'omodimero CD8 $\alpha\alpha$ , coerente quindi con l'origine intraepiteliale linfoide. Inoltre, l'espressione della leucointegrina  $\alpha E$  (CD103) sulle cellule tumorali e leucemiche sostiene l'origine intestinale di questo linfoma. Nel cane, la maggior parte dei linfociti intestinali intraepiteliali sono, allo stesso modo, CD3+ con una sovrabbondanza di CD8+ rispetto ai CD4+, e fino al 35% delle cellule esprime il TCR- $\gamma\delta$  (Sonea *et al.*, 2000).

Il linfoma epatosplenico del cane è una rara e aggressiva forma di linfoma composta da linfociti TCR- $\gamma\delta$ + che coesprimono la leucointegrina  $\alpha D\beta 2$  (CD11d), che in condizioni fisiologiche è maggiormente espressa dai linfociti e macrofagi della polpa rossa splenica, e per tale motivo il sito origine di questa neoplasia viene imputato alla milza (Fry *et al.*, 2003).

Una condizione linfoproliferativa comune nel cane è la leucemia linfocitica cronica (LLC), di cui sono stati riportati il 54% dei casi come di morfologia LGL (Vernau *et al.*, 1999). Questa neoplasia indolente è tipica dei cani anziani ed è associata a splenomegalia e coinvolgimento midollare minimo. La valutazione citofluorimetrica globale ha determinato che la maggioranza delle LLC nei cani esprimono CD8 e  $\alpha D\beta 2$ , con una più frequente coespressione del TCR- $\alpha\beta$  che del TCR- $\gamma\delta$  (Vernau *et al.*, 1999). I linfociti di cane che esprimono CD3, CD8, bassi livelli di CD5 ed il TCR- $\alpha\beta$  potrebbero avere proprietà funzionali analoghe alle cellule natural killer (NK) in altre specie (Lin *et al.*, 2010). Tuttavia, le cellule NK-like sono eterogenee nell'uomo e nel topo, ed altri tipi di linfociti con proprietà NK-like potranno essere verosimilmente scoperte in futuro nel cane (Lin *et al.*, 2010).

Gli anticorpi disponibili per gli antigeni linfocitari di cavallo sono più limitati, ma l'indagine citofluorimetrica di versamenti neoplastici in casi limitati ha riportato una prevalenza di cellule T CD4+, in accordo con il fenotipo CD3 sui preparati IHC di linfomi multicentrici e intestinali (Meyer *et al.*, 2006). Variazioni nella proporzione dei linfociti circolanti ematici sono stati identificati anche in cavalli con linfomi cutanei, con le masse che invece presentavano un pattern misto di linfociti T CD4+ e CD8+ (de Brujin *et al.*, 2007). I reagenti per l'immunofenotipizzazione dei linfociti bovini sono pochi e sono stati applicati per l'indagine delle linfoproliferazioni indotte dal virus della leucemia bovina (Bovine Leukemia Virus, BLV) (Beyer *et al.*, 2002). Un numero di bovini infetti con BLV ha sviluppato linfocitosi persistente

composta da linfociti policlonali positivi per CD<sup>+</sup> e per l'immunoglobulina di superficie M (immunoglobulina di superficie), mentre i tumori solidi esprimevano CD5, immunoglobulina di superficie M, MHC class II e solo un tipo di catena leggera (Wu *et al.*, 1999).



**Figura 2.6.** Cane, analisi citofluorimetrica di aspirato linfonodale. La maggior parte delle cellule sono CD3<sup>+</sup> e CD21<sup>-</sup>. La marcatura con anticorpo CD79 $\alpha$ -PE di cellule permeabilizzate suggerisce che il 36,9% delle cellule sono positive. Fonte: **Reggeti F, Bienzle D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol.* 2011; 48:223-235.

**Tabella 2.2.** Anticorpi comunemente utilizzati per la fenotipizzazione delle neoplasie ematiche del cane.

<b>Anticorpi Linfoidi</b>	
Anti-CD3	Linfociti T
Anti-CD5	Linfociti T
Anti-CD4	Linfociti T CD4 (Helper), neutrofilii
Anti-CD8	Linfociti T CD8 (Citotossici)
Anti-CD21	Linfociti B maturi
Anti-CD22	Linfociti B
Anti-CD79 $\alpha$	Linfociti B (tutti gli stadi di maturazione)
Anti-Pax5	Linfociti B
<b>Anticorpi Mieloidi</b>	
Anti-CD14	Monociti
Anti-CD18	Neutrofilii, monociti
Anti-CD4	Neutrofilii, linfociti T CD4
Anti-MPO	Neutrofilii, monociti
Anti-CD11b	Granulociti, monociti, alcuni macrofagi
Anti-CD11c	Granulociti, monociti, cellule dendritiche
Anti-CD11d	Macrofagi, linfociti T
<b>Altri Anticorpi</b>	
Anti-CD45	Tutti i leucociti
Anti-CD11a	Tutti i leucociti
Anti-CD34	Cellule staminali, cellule progenitrici
Anti-MHC class II	Monociti, linfociti B, linfociti T

### ◆ *Stadiazione del tumore*

Il WHO riconosce cinque differenti stadi del linfoma sulla base dell'invasione di diversi organi, e due sotto-stadi in relazione ai segni clinici. La stadiazione del linfoma è cruciale sia in medicina veterinaria che umana, ed è ben risaputo che lo stadio V del linfoma (con invasione del midollo osseo e del sangue periferico) è caratterizzato da una prognosi infausta e un tempo di sopravvivenza mediano nettamente inferiore rispetto alla neoplasia dallo stadio I a IV (Vail and Young, 2007).

L'investigazione del coinvolgimento di sangue e midollo osseo avviene mediamente valutazione morfologica del sangue periferico e di aghi aspirati o biopsie "tru-cut" del midollo osseo. Tuttavia, questo approccio ha una specificità scarsa poiché le cellule neoplastiche, ed in particolare quelle dei linfomi a basso grado, difficilmente si distinguono dalle cellule linfoidi reattive. La valutazione morfologica può avere anche basse sensibilità e accuratezza, poiché le infiltrazioni del midollo di basso grado possono essere difficili da osservare, e la variabilità inter-osservatore è un'evenienza frequente. Nonostante il 30% sia il valore considerato in genere come "cut-off" per l'infiltrazione del midollo, questo dovrebbe probabilmente essere abbassato per adiuvarne l'identificazione dei casi con scarso outcome (Marconato *et al.*, 2008). La CF può essere utilizzata per rilevare piccole percentuali di cellule infiltranti in maniera rapida ed accurata. Secondo alcuni autori, la sensibilità della CF è piuttosto elevata nell'individuare infiltrazioni anche dell'1%, ma la specificità di questa metodica è più variabile poiché dipende primariamente dalle caratteristiche delle cellule neoplastiche. Il linfoma diffuso a grandi cellule B, il linfoma del cane più frequentemente diagnosticato, è caratterizzato da grandi linfociti CD21+CD79+ che possono essere facilmente riconosciuti nel sangue e nel midollo osseo utilizzando una marcatura a due colori. Per i linfomi a piccole

cellule, soprattutto quelli di fenotipo B o T CD4, la differenziazione tra cellule neoplastiche e quelle normali o reattive può essere difficoltosa per cui la specificità può risultare maggiore se sono presenti pattern antigenici aberranti. La stessa tecnica può essere utilizzata per valutare l'infiltrazione tumorale di altri organi come fegato e milza, anche se l'esame bioptico per ago aspirato di questi tessuti può contenere un numero insufficiente di cellule che rendano la CF effettuabile (Comazzi *et al.*, 2011).

#### ◆ *Malattia minima residua*

Un punto cruciale della gestione del paziente con tumore emopoietico è la valutazione dello status di *malattia minima residua* (MMR), che viene definita come il numero di cellule neoplastiche che rimangono dopo il trattamento. Poiché la MMR è spesso correlata con la remissione della malattia e/o la recidiva, la sua valutazione accurata tramite valutazione morfologica, citofluorimetrica, citogenetica, ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) ha un ruolo fondamentale. In medicina umana, la MMR viene valutata mediante PCR quantitativa, che è altamente sensibile e specifica (è in grado di rilevare una cellula neoplastica su  $10^6$  cellule normali) (van Dongen *et al.*, 2003).

Negli animali la risposta alla terapia viene valutata in base alla riduzione della linfoadenomegalia e sulla valutazione citomorfologica di aghi aspirati, nonostante quest'ultimo abbia bassa sensibilità e specificità (rileva, in media, cinque cellule neoplastiche su 100 cellule normali) (Bartola e Viswamtha, 2001). La citofluorimetria di supporto può aumentare la sensibilità di rilevazione ( $\leq 1$  neoplastica su 100 cellule normali), ed è sia rapida che poco costosa. Quando vengono utilizzati dei protocolli citofluorimetrici standardizzati multi-parametrici può essere rilevata più di una cellula neoplastica in un numero di  $10^4$  cellule

normali. Ad oggi sono ancora poche le indagini approfondite sulla MMR dei cani mediante CF, ma il suo utilizzo a questo fine risulta idoneo, fin quando tecniche molecolari più sensibili non verranno sviluppate (Comazzi et al, 2011).

La CF è usata nella valutazione della MMR tramite analisi di campioni provenienti dai linfonodi superficiali che si sono ridotti di dimensione, e spesso, questi campioni contengono solamente linfociti B e T residenti. Nei campioni di sangue e midollo osseo, le cellule neoplastiche di un linfoma B ad alto grado possono essere facilmente identificate sulla base delle loro proprietà di *scatter* e del loro fenotipo. Al contrario, l'utilizzo della CF nell'analisi della MMR dei linfomi a piccole cellule è ostacolato dalla difficoltà di identificazione morfologica delle cellule neoplastiche rispetto a quelle normali, soprattutto se non sono presenti pattern antigenici aberranti (Comazzi *et al.*, 2011). Un recente studio ha tuttavia dimostrato che la sensibilità nella rilevazione della MMR mediante citofluorimetria aumenta quando quest'ultima viene combinata alla più sensibile PARR in cani con DLBCL trattati con chemioterapia nella rilevazione di cellule grandi CD21+, alla quale è correlata la previsione di outcome e di recidiva (Aresu *et al.*, 2014; Chalfon *et al.*, 2019).

#### ◆ *I limiti della citofluorimetria nella diagnosi di linfoma del cane*

La CF sugli aghi aspirati di linfoma è una tecnica rapida, semplice ed economica, e può essere effettuata su campioni che sono stati trasportati da luoghi distanti dal laboratorio di analisi. Poiché la CF non è attualmente disponibile in tutti i laboratori di diagnostica, però, i campioni possono essere inviati ai laboratori mediante sospensione in RPMI e refrigerati. Le cellule dovrebbero essere poi processate entro le 24 ore. Le cellule neoplastiche grandi sono più fragili, soprattutto se il paziente è stato trattato con corticosteroidi; in queste circostanze le

cellule che si rompono vengono rilevate dal citofluorimetro come un basso numero di eventi FSC, e lo strumento è in grado di rilevare solamente i piccoli linfociti residenti, che sono più robusti e non deteriorati: l' esame citologico concomitante di un vetrino proveniente dalla stessa matrice è quindi necessario per differenziare le forme neoplastiche medie-grandi dalle cellule meramente reattive. Le cellule non vitali possono essere marcate con ioduro di propidio e identificate usando la fluorescenza.

La lisi dei globuli rossi è necessaria quando i campioni sono fortemente emodiluiti, ad esempio nel caso dei linfomi a piccole cellule, poiché i globuli rossi oscurano lo *scatter* delle cellule neoplastiche. In questi casi, la marcatura con CD45 può aiutare nella differenziazione tra cellule linfoidi ed eritroidi. Un altro limite della CF nella diagnosi del linfoma canino è la relativa mancanza di anticorpi disponibili in questa specie, e la mancanza di informazioni riguardo l'architettura tissutale che questa tecnica non è in grado di fornire (Comazzi *et al.*, 2011).

### *Malattie Mieloproliferative*

La leucemia acuta caratterizzata da blasti indifferenziati con uno o più nucleoli prominenti, ma che non mostrano aspetti morfologici di una specifica *lineage* cellulare, rimane una malattia con una prognosi scarsa negli animali (Usher *et al.*, 2009; Valli, 2007; Villiers *et al.*, 2006). I metodi tradizionali per assegnare una *lineage* cellulare sono la reattività citochimica e/o la valutazione ultrastrutturale, ma queste tecniche richiedono un'esperienza tecnica e attrezzature non disponibili in maniera diffusa, sono difficilmente quantificabili e hanno un'interpretazione soggettiva. La classificazione della leucemia acuta in mielocitica, megacariocitica, eritrocitica, monocitica, linfocitica o indifferenziata ha importanza per capire aspetti unici della patogenesi e può dare informazioni prognostiche, e quindi indirizzare verso

un approccio terapeutico razionale (Usher *et al.*, 2009; Novacco *et al.*, 2016). Nonostante la caratterizzazione mediante citofluorimetria richieda, allo stesso modo, esperienza tecnica e attrezzature non così diffusamente disponibili, la sua vera forza risiede nella valutazione di caratteristiche multiple in un elevato numero di cellule attraverso criteri piuttosto oggettivi. Lo stato dell'arte nella caratterizzazione della leucemia acuta in medicina umana consiste in test citogenetici, genetici molecolari, test di immunofenotipizzazione e, sempre di più, nell'assetto del profilo di espressione genetica (Te Kronnie *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2001). La CF può avere un ruolo sostanziale nel rifinire la diagnosi morfologica di leucemia acuta negli animali, fin quando non saranno messi a punto test molecolari più specifici; ad oggi, anche la PCR per il riarrangiamento antigenico è stata utilizzata per la caratterizzazione molecolare in termini di riarrangiamento dei recettori B e T rilevando elevate percentuali di riarrangiamento (64%), rendendo questo test poco sensibile nella distinzione tra le forme leucemiche dai linfomi al V stadio (Stokol *et al.*, 2017). Le cellule neoplastiche della leucemia acuta mieloide e linfoide esprimono comunemente il marker delle cellule staminali ematopoietiche CD34, che può essere identificato nei cani con anticorpi specifici (Vernau *et al.*, 1999; Villiers *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008). La rilevazione di questo antigene nelle cellule neoplastiche facilita la distinzione tra leucemia acuta e linfoma al V stadio con linfocitosi neoplastica, ma non è in grado di classificare il tipo di leucemia (Tasca *et al.*, 2009). L'espressione del CD34 da parte delle cellule leucemiche nei cani, di conseguenza, implica una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto alla leucemia con cellule negative per il CD34 (Williams *et al.*, 2008).

L'identificazione concomitante di antigeni *lineage*-specifici (ad esempio la mieloperossidasi, elevata nei granulociti e bassa nei monociti) e l'espressione dell'antigene neutrofilo-specifico

(NSA, dei granulociti), CD14 o MAC387 (dei monociti), e CD14, CD61, CD62P, il fattore di Von Willebrand (dei megacariociti), o il CD9 (piastrinico) consente la classificazione della leucemia acuta (Ameri *et al.*, 2010; Comazzi *et al.*, 2006; Gelain *et al.*, 2008; Wilkerson *et al.*, 2005; Valentini *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2018)). Nell'ultimo decennio l'attenzione a queste malattie è cresciuta, e mediante la tecnica citofluorimetrica è stato possibile individuare e descrivere sindromi rare (Comazzi *et al.*, 2017; Rout *et al.*, 2017).

### *Contenuto di DNA tumorale*

L'analisi citofluorimetrica del DNA non si basa sugli anticorpi, e la possibilità di utilizzare sospensioni cellulari di tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina consente l'utilizzo di materiale d'archivio (Ayl *et al.*, 1992; Bolon *et al.*, 1990; Clemo *et al.*, 1994; Fraziers *et al.*, 1993; Madewell *et al.*, 1991). Teoricamente, un'elevata proporzione di cellule che contiene un DNA asimmetrico (aneuploide) dovrebbe riflettere anomalie genetiche di un tumore, mentre un'elevata proporzione di cellule che sintetizza DNA dovrebbe essere riflesso di una crescita rapida (Hall, 2004). Cellule aneuploidi sono state descritte nel mastocitoma (Ayl *et al.*, 1992), melanoma (Bolon *et al.*, 1990), carcinoma a cellule di transizione (Clemo *et al.*, 1993; Clemo *et al.*, 1994), plasmocitoma (Frazier *et al.*, 1993), emangiopericitoma (Kang *et al.*, 2006), carcinoma prostatico (Madewell *et al.*, 1991), osteosarcoma (Fox *et al.*, 1990), tumore mammario (Rutterman *et al.*, 1988) e linfoma del cane (Teske *et al.*, 1993), e nel tumore mammario del gatto (Minke *et al.*, 1990). In 3 studi, l'aneuploidia era presente nel 31% dei mastocitomi, nel 79% dei tumori a cellule di transizione, e nel 27% degli emangiopericitomi (Ayl *et al.*, 1992; Clemo *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 2006), nonostante la correlazione con la sopravvivenza non fosse significativa in nessuno degli studi. Possibili motivazioni che giustificano lo scarso potere prognostico dell'aneuploidia riguardano la mescolanza con

numerose cellule non neoplastiche nell'analisi l'eterogeneità tumorale e la necrosi (Hall, 2004). Tumori benigni e lesioni infiammatorie o iperplastiche dovrebbero avere un contenuto di DNA diploide (Fox *et al.*, 1990), mentre cellule multinucleate (come le cellule giganti in infiammazioni granulomatose, i megacariociti, e i tessuti iperplastici o in rigenerazione con numerose figure mitotiche) dovrebbero avere cellule poliploidi (Boudreaux *et al.*, 1996), mentre cellule necrotiche o apoptotiche possiedono un contenuto di DNA ipodiploide. L'inclusione di tali cellule nelle analisi del DNA oscura la rilevazione delle cellule aneuploidi (Hall, 2004). Il valore prognostico dell'analisi del DNA è stato tuttavia riportato nel melanoma orale del cane, tumori mammari e osteosarcoma (Bolo *et al.*, 1990; Hellmen *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1990).

#### *Altre applicazioni in Oncologia Veterinaria*

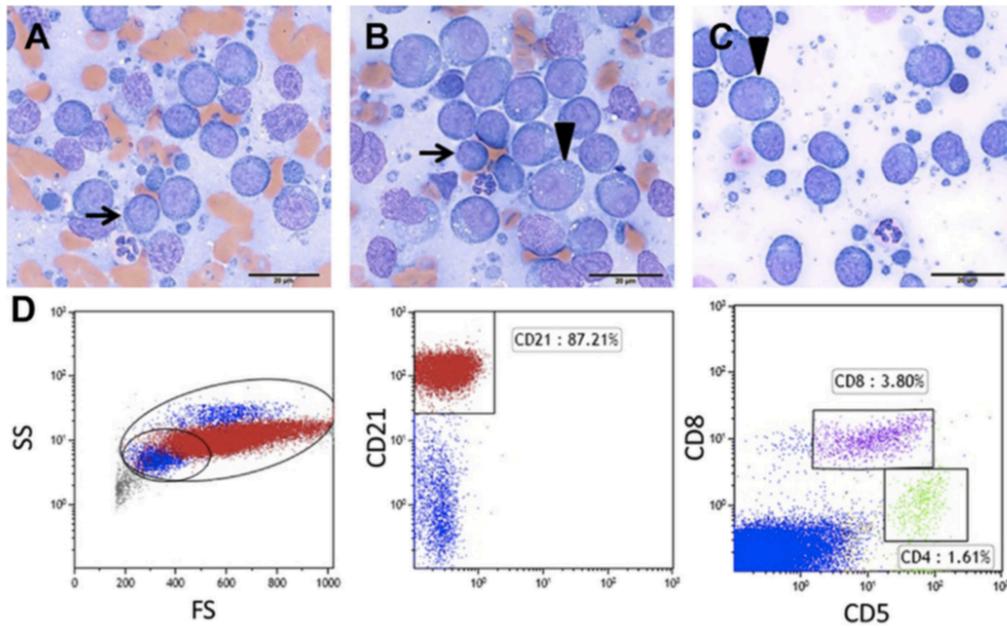
La CF è stata utilizzata per valutare l'espressione di antigeni di superficie o intracellulari espressi tipicamente da cellule tumorali, o che fossero predittivi del comportamento tumorale. Ad esempio, la valutazione di cellule di osteosarcoma canino in sospensione ha consentito l'identificazione del recettore per le chemochine CXCR4 che è unicamente espresso nei tumori primari, ma non metastatici (Fan *et al.*, 2008). Allo stesso modo, il prodotto proteico del protooncogene chinasi tropomiosina-correlata-A è stato identificato tramite CF su cellule di osteosarcoma, e la sua presenza ne implica una resistenza all'apoptosi (Fan *et al.*, 2008).

È stato disegnato anche un test citofluorimetrico per rilevare la proteina 1 associata alla resistenza multifarmaco e la glicoproteina P su linfociti di cane, valutandone in concomitanza la ritenzione di fluorescenza citoplasmatica (Schleis *et al.*, 2008); in seguito, la resistenza all'apoptosi mediante misurazione di Bcl-2/Bax è stata inoltre indagata in maniera preliminare

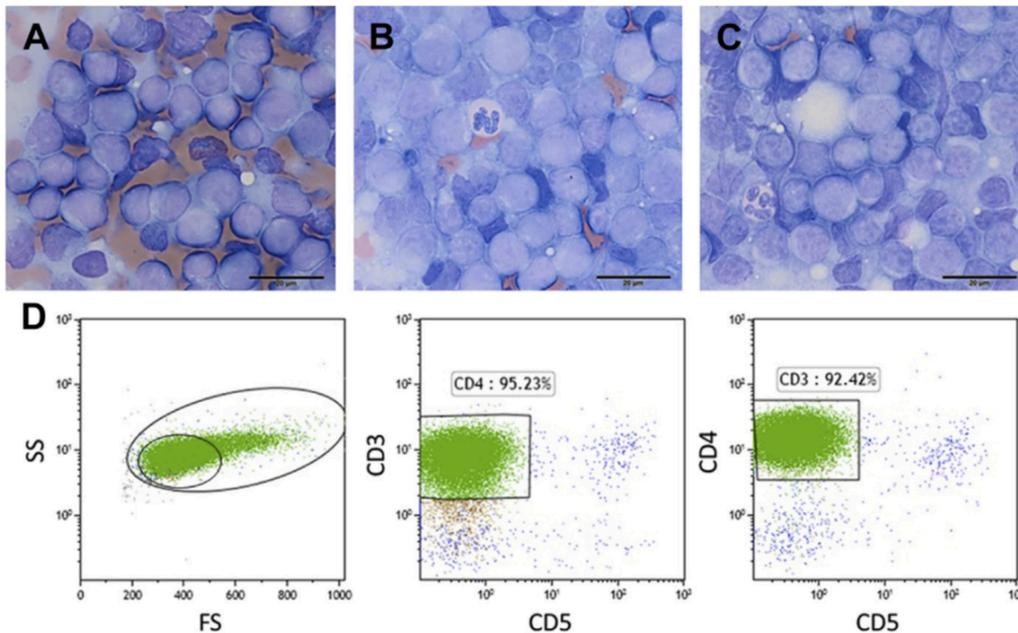
come possibile fattore prognostico in cani trattati con terapia citotossica (Melchner *et al.*, 2016). Ulteriori indagini sono tuttavia necessarie per validare i marker di resistenza alla terapia mediante misurazione citofluorimetrica, che potrebbero potenzialmente portare a sviluppi nell'approccio terapeutico al linfoma.

Una delle attuali frontiere in campo biomedico umano è il concetto di "biopsia liquida", ovvero la ricerca e quantificazione del DNA e delle cellule tumorali circolanti; attualmente questa tecnica è utilizzata per la prognosi e il monitoraggio della terapia di neoplasie comuni nell'uomo quali il tumore al seno, il carcinoma prostatico ed altri (Krebs *et al.*, 2010; de Albuquerque, *et al.* 2012). In medicina veterinaria, tuttavia, questa tecnica ha da poco acquisito interesse scientifico e ancora molto poco è stato descritto sul possibile ruolo che questa potrebbe avere nella pratica diagnostica oncologica e nello studio funzionale delle neoplasie (Wright *et al.*, 2019; Tagawa *et al.*, 2019).

In conclusione, la CF è una tecnica ad elevata utilità per la classificazione dei tumori emolinfoidi. Con l'aumentare della disponibilità degli anticorpi e di citofluorimetri accessibili, è verosimile la possibilità che questo rientri presto ad essere un componente di molti laboratori ematologici veterinari, mentre le sue applicazioni in altre aree dell'oncologia veterinaria rimangono ancora da esplorare a pieno.



**Figura 2.7.** Aspirati linfonodali (A-C) di 3 casi di cani con DLBCL e relative caratteristiche citofluorimetriche (D). Linfoblasti basofilici con nucleo rotondo e nucleoli prominenti, di dimensioni che variano da quella di un neutrofilo (freccia) a 1,5-2 volte quella di un neutrofilo (testa di freccia). Alla citofluorimetria, il CD21 comprende la maggior parte delle cellule (in rosso) che sono di dimensioni medio-grandi. Fonte: **Reggeti F, Bienziele D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol. 2011; 48:223-235.*



**Figura 2.8.** Aspirati linfonodali (A-C) di 3 casi di cani con linfoma T CD4+ e relative caratteristiche citofluorimetriche (D). I linfociti hanno un nucleo da rotondo ad indentato, cromatina dispersa e citoplasma chiaro. I nucleoli non sono tipicamente visibili nella maggior parte delle cellule. I linfociti CD4+ (in verde) hanno generalmente dimensione media, con alcune sovrapposizioni ai linfociti normali. Alcuni questi casi, come mostrato nel plot centrale e a destra, hanno perso l'espressione del CD5. Fonte: **Reggeti F, Bienziele D.** *Flow cytometry in veterinary oncology. Vet Pathol. 2011; 48:223-235.*

## Capitolo IV · Contributo sperimentale

### **Confronto tra immunoistochimica e citofluorimetria nella valutazione del Ki-67 index nel linfoma del cane.**

Ki-67 è una proteina nucleare strettamente associata alla proliferazione cellulare per via della sua espressione durante tutte le fasi attive del ciclo cellulare ( $G_1$ , S,  $G_2$ , e mitosi) ed assenza nelle cellule quiescenti ( $G_0$ ) (Bruno *et al.*, 1992). La valutazione del Ki-67 tumorale come indice di proliferazione (Ki-67 index) ha trovato ampio interesse negli ultimi decenni sia in oncologia umana che veterinaria per via dell'importante ruolo di questa proteina nel comportamento biologico delle neoplasie. In particolare, sia il ruolo prognostico (Bergin *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2016; Araujo *et al.*, 2016; Penault-Llorca and Radosevic-Robin, 2017; Kreipe, 2018; Kiupel e Camus, 2019) che diagnostico (Bryant *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Carrasco *et al.*, 2015; Sabattini *et al.*, 2015; Sabattini *et al.*, 2018) del Ki-67 sono stati dimostrati in diversi tipi di tumore, così come il suo ruolo predittivo di risposta tumorale alla terapia (Melzer *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2016; Schlotter *et al.*, 2017). Diversi studi hanno provato a definire il ruolo del Ki-67 anche nel linfoma del cane, ma i risultati sono ancora discordanti (Kiupel *et al.*, 1999; Philips *et al.*, 200; Sokolowska *et al.*, 2012; Sierra-Matiz *et al.*, 2018). Nonostante siano stati proposti diversi metodi innovativi di conta semi-automatica per la valutazione del Ki-67 (Klimovitz *et al.*, 2012; Blaker *et al.*, 2015; Hida *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Maeda *et al.*, 2016; Røge *et al.*, 2016; gaudio *et al.*, 2018; Öztürk Sari *et al.*, 2018; Kreipe H, 2018), il gold standard attuale è l'esame immunoistochimico (IHC) seguito

da conta manuale delle cellule tumorali positive nelle aree a maggiore proliferazione, ma la mancanza di una metodica standardizzata e gli errori legati all'operatore ne rappresentano ancora un grande limite (Penault-Llorca e Radosevic-Robin, 2017). Nell'ultimo decennio, la citofluorimetria a flusso (CF) si è fatta spazio nell'oncoematologia veterinaria diventando progressivamente lo strumento in prima linea per la diagnosi delle malattie linfoproliferative del cane (Burkhard e Bienzle, 2013; Rout e Avery, 2017). Questa tecnica consente l'immunofenotipizzazione simultanea delle cellule attraverso marcatura con diversi anticorpi coniugati a coloranti fluorescenti che emettono lunghezze d'onda peculiari dopo essere state eccitate da un fascio luminoso. Questo test è rapido e minimamente invasivo, poiché il campione richiesto è un semplice ago aspirato.

La valutazione del Ki-67 è stata recentemente inclusa nella valutazione tramite CF del linfoma, con l'identificazione di un suo significato prognostico nei linfomi B citologicamente ad alto grado (Poggi *et al.*, 2017). Tuttavia, i risultati di questa analisi non sono mai stati confrontati con l'attuale metodo gold standard. Il fine di questo studio preliminare è quello di indagare la concordanza tra IHC e CF nella valutazione del Ki-67 index nei linfomi nodali del cane. Inoltre, è stata valutata anche l'utilità prognostica dell'indice di proliferazione con entrambe le metodiche in un gruppo di cani affetti da linfoma B a grandi cellule (DLBCL) trattati con chemioterapia, per valutare se la CF possa essere considerata una valida tecnica alternativa non invasiva e rapida nel fornire indicazioni prognostiche sul comportamento biologico neoplastico.

## 4.1 Materiali e Metodi

### *Criteri di inclusione*

In questo studio sono stati inclusi in maniera prospettica cani con prima presentazione di linfoma ai linfonodi periferici diagnosticato con esame citologico e citofluorimetrico a partire da ago aspirato, e sottoposti conseguentemente a linfadenectomia diagnostica. Gli animali sono pervenuti presso gli Ospedali Veterinari delle Università di Medicina Veterinaria di Vienna e del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, da Marzo 2018 a Giugno 2019. Dal momento della diagnosi alla linfadenectomia non sono state somministrate terapie. La cartella clinica di ogni singolo cane è stata esaminata per la raccolta dei dati demografici tra cui razza, sesso, età. Per i cani con DLBCL che hanno ricevuto trattamento chemioterapico sono state anche raccolte le seguenti informazioni: stadio clinico della malattia, protocollo chemioterapico, intervallo di progressione libero da malattia (PFI) e sopravvivenza (OS).

### *Citofluorimetria*

L'esame citofluorimetrico è stato effettuato presso il Dipartimento di Patobiologia, Servizio di Patologia Clinica, dell'Università di Medicina Veterinaria di Vienna, dal medesimo operatore. Per l'analisi citofluorimetrica, la sospensione cellulare è stata marcata con anticorpi anti-cane o anti-uomo con cross-reattività (Tabella 2.3). Per ogni analisi, un numero da  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  di cellule è stato marcato come descritto precedentemente (Rütgen *et al.*, 2010). Le cellule marcate sono state analizzate con un citofluorimetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) immediatamente dopo l'incubazione con gli anticorpi. Per gli anticorpi intracellulari è stato

utilizzato il kit Anti-Human Foxp3 PE (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni del produttore. Il Ki-67 index è stato definito come percentuale di cellule positive all'interno del gate neoplastico su una base di 20.000 cellule (eventi) analizzati e registrati.

### *Istologia ed immunoistochimica*

La valutazione dell'istotipo del linfoma è stata effettuata secondo le linee guida WHO dallo stesso patologo (AFB) su campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE), allestiti in sezioni di 2  $\mu\text{m}$  e colorati con ematossilina-eosina (Valli *et al.*, 2016). Per ogni caso incluso è stato valutato il grado istologico sulla base della classificazione proposta da Valli *et al.*, 2013. Sezioni seriali di ogni caso sono state inoltre sottoposte a saggio immunoistochimico con CD3 e CD79a per valutazione dell'immunofenotipo. L'incubazione con CD3, CD79a e Ki-67 è stato effettuato attraverso immuno coloratore Autostainer 360 (Lab Vision, Thermo Fisher Scientific). È stato impiegato il metodo HRP-Polymer. I blocchetti FFPE sono stati tagliati in sezioni di 2  $\mu\text{m}$ , sparaffinati, reidratati e pretrattati con buffer citrato caldo a pH 6 per 20 minuti per lo smascheramento antigenico. Per ridurre le colorazioni di fondo, le sezioni sono state incubate con Hydrogen peroxidase Block (Thermo Fisher Scientific) per 5 minuti e poi in Ultra Vision Protein Block (Thermo Fisher) per altri 10 minuti. E' stato poi incubato l'anticorpo primario monoclonale anti-mouse verso Ki-67 (Dako, Glostrup, Danimarca) con diluizione 1:250, per 30 minuti, e conseguentemente con quello secondario (Bright Vision poly HRP anti-mouse IgG; Immunologic, Duiven, Olanda) per altri 30 minuti. Per la visualizzazione del risultato è stato utilizzato il cromogeno DAB Quanto (Thermo Fisher Scientific) per 5 minuti. Le sezioni sono state poi

controcolorate in ematossilina di Mayer, disidratati, messi in soluzione Neo-Clear ed infine montati con Neo-Mount (Merck, Darmstadt, Germania).

La valutazione del Ki-67 index sulle sezioni IHC è stata effettuata ad insaputa dei risultati di CF da uno solo degli autori (AR) per ridurre l'errore relativo all'operatore. Cinque campi a forte ingrandimento (400x) sono stati fotografati per ogni caso. In ogni immagine è stato contato manualmente, mediante un software di conta cellulare digitale (Fiji-ImageJ Cell Counter, US National Institute of Health, Bethesda), il numero di cellule positive e negative al Ki-67. Il Ki-67 index è stato calcolato come valore percentuale medio nei 5 campi delle cellule neoplastiche positive.

#### *Analisi statistica*

Quando indicato, i dati sono stati testati per la distribuzione di normalità usando il test omnibus D'Agostino e Pearson. I valori sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard nei casi di distribuzione normale, o di media con range nei casi di distribuzione non normale. La relazione tra il Ki-67 index (valutato sia mediante IHC che CF) ed il pattern istopatologico (nodulare o diffuso) ed il grado è stata valutata con il test Mann-Whitney U test e Kruskal-Wallis rispettivamente. La correlazione tra i Ki-67 index con IHC e CF è stata valutata con il coefficiente di correlazione Spearman's Rank. I limiti di concordanza tra le due tecniche sono stati stimati con il Bland-Altman plot.

Per i DLBCL, l'intervallo di progressione libero da malattia (PFI) e la sopravvivenza (OS) sono stati definiti come i giorni dalla somministrazione del primo trattamento alla progressione della

malattia e alla morte per linfoma rispettivamente. Cani che non hanno sviluppato progressione della malattia, deceduti per altre cause o ancora vivi al momento dell'analisi dei dati sono stati censurati all'ultimo giorno di follow-up. Le stime di sopravvivenza sono state presentate come mediane con i rispettivi intervalli di confidenza del 95% (95% CI). L'analisi della sopravvivenza univariata (lo-rank test) è stato condotto per le seguenti variabili: stadio clinico (III-IV contro V), grado istologico (basso-intermedio contro alto), e i Ki-67 index valutati con entrambe le metodiche. A questo fine, il Ki-67 index è stato dicotomizzato usando la mediana come cut-off. Il significato prognostico del Ki-67 index è stato inoltre valutato stratificando i valori nelle tre categorie proposte da Poggi *et al.*, 2017. Per ogni categoria, le differenze del tasso di sopravvivenza a 6 mesi sono state valutate attraverso il Fisher's exact test. I dati sono stati analizzati con software (SPSS statistics, V 19, IBM, Armonk, NY). Il *P* value < 0.05 sono stati considerati come significativi.

## 4.2 Risultati

### *Informazioni demografiche e cliniche*

Trentadue cani corrispondevano ai criteri di inclusione e sono quindi stati inclusi in questo studio. Erano presenti 8 meticci, (3 di grande taglia, 4 di media taglia e 1 di piccola taglia) e 24 cani di razza; tra questi, le razze più rappresentate erano il Rottweiler (n=3), il Fox Terrier (n=2), il Carlino (n=2), il Bull Terrier (n=2) ed il Pastore tedesco (n=2). Erano presenti 4 maschi interi, 7 castrati, 10 femmine intere e 11 sterilizzate. L'età media era  $8.2 \pm 2.5$  anni (range 1-13).

### *Istopatologia*

Secondo la diagnosi istopatologica finale, i linfomi a cellule B (n=25; 78%) includevano 22 linfomi diffusi a grandi cellule (DLBCL), 1 linfoma linfoblastico e 2 linfomi della zona marginale, mentre i linfomi T (n=7; 22%) includevano 5 linfomi T periferici e 2 linfomi della zona-T. il tempo medio tra l'esame CF e quello istologico era 3.5 giorni (range, 0-7). Inoltre, erano presenti 7 linfomi basso grado (22%), 11 di grado intermedio (34%) e 14 linfomi di alto grado (44%) secondo la classificazione di Valli *et al.*, 2013.

### *Ki-67*

Il Ki-67 index mediano con CF era 48% (range, 2-99%), mentre con IHC era 51% (range, 7-93%) (Fig. 1). Il coefficiente di correlazione di Spearman era 0.57 (P = 0.0003; Fig. 2). La correlazione era statisticamente significativa sia nei linfomi nodulari che diffusi. Con entrambe le metodiche, il Ki-67 index era significativamente più alto nei linfomi diffusi e nei linfomi di grado alto/intermedio (Tabella 2.4). Secondo il bland-Altman plot, l'errore tra le due tecniche era del 4% e i limiti di concordanza al 95% erano dal -50.23 a 51.06% (Fig.3).

### *Analisi dei fattori prognostici*

Tra i 21 cani affetti da DLBCL e con informazioni di follow-up disponibili, un cane era in stadio III, 10 cani erano in stadio IV e 10 cani in stadio V; due sono stati trattati con protocollo L-CHOP, 17 con protocollo CHOP e 2 con protocollo COP. Il PFI mediano era 338 giorni (95% CI, 80-595), mentre l'OS mediano non è stato raggiunto. In analisi univariata, né il grado istologico, né il Ki-67

index erano associati con PFI e OS; i cani in stadio V erano associati ad un significativo outcome peggiore (Tabella 2.5).

Il tasso di sopravvivenza a 6 mesi era 13/18 (72,2%). Stratificando i casi secondo le categorie proposte da Poggi *et al.* (2017) non era presente nessuna differenza significativa nel tasso di sopravvivenza a 6 mesi in entrambe le tecniche ( $P = 0.0010$ ; Tabella 2.6).

### 4.3 Discussione

Un vantaggio importante delle malattie linfoproliferative è la loro immediata idoneità ad essere analizzati attraverso CF come campione fresco di cellule, senza la necessità di complesse procedure di processazione del tessuto prima dell'incubazione anticorpale. La CF consente di avere una buona accuratezza nella diagnosi differenziale tra linfoma ed iperplasia reattiva, così come nella determinazione dell'immunofenotipo linfomatoso (Comazzi e Gelain, 2011; Burhard e Bienze, 2013). Tuttavia, secondo gli attuali standard per le migliori cure, l'esame istologico del linfonodo chirurgicamente rimosso è l'esame necessario per la valutazione del pattern istologico e dell'immunofenotipo, consentendo quindi la determinazione del sottotipo di linfoma, che è risaputo essere di fondamentale importanza prognostica (Valli *et al.*, 2013). Questo limita il ruolo della CF, così come quello della citologia, a quello di analisi ausiliarie per risultati preliminari, facendo dell'istologia e dell'IHC i metodi gold standard per la diagnosi conclusiva di linfoma (Reggeti e Bienze, 2011). L'IHC è anche la metodica standard per la valutazione dell'attività proliferativa tumorale, nonostante sia soggetta ad una interpretazione soggettiva dei risultati.

Data la natura strettamente quantitativa dell'analisi del Ki-67 index, la CF possiede il potenziale di essere una valida alternativa per la sua stima nel linfoma del cane, e ciò viene sostenuto dai

risultati incoraggianti ottenuti da altri autori (Poggi *et al.*, 2015; Poggi *et al.*, 2017). Per questi motivi, la validazione del Ki-67 index in CF rispetto al metodo gold standard può implicare utili riscontri pratici, e rappresentare la prima parte di una più ampia comparazione tra le accuratezze di CF ed istopatologia nella determinazione della diagnosi di linfoma.

In questo studio preliminare è stata valutata per la prima volta la concordanza tra CF e IHC nella valutazione del Ki-67 index in cani con linfoma nodale. I risultati indicano una correlazione sostanziale tra le due tecniche, indipendentemente dal pattern del linfoma (follicolare o diffuso). È stato inoltre incoraggiante osservare che, con entrambe le metodiche, il Ki-67 index era significativamente più elevato nei linfomi ad alto grado. Tuttavia, in un numero non indifferente di casi, le discrepanze tra IHC e CF erano prominenti, riducendo così la correlazione complessiva. Questo può essere spiegato con le differenze legate alla tecnica, come ad esempio il significativo numero più elevato di cellule analizzato tramite CF rispetto all'IHC (in media 10.000 contro 5.000 cellule rispettivamente), insieme ai già menzionati limiti legati a quest'ultima. Inoltre, la CF consente la simultanea immunofenotipizzazione delle cellule proliferanti, evitando così l'inclusione, nell'analisi, dei legami aspecifici dell'anticorpo, e rendendo più semplice la discriminazione tra cellule neoplastiche e non neoplastiche. Complessivamente, ciò supporterebbe una maggiore accuratezza della CF rispetto all'IHC.

Purtroppo, il confronto dell'utilità prognostica di entrambi gli indici non è stato d'aiuto nella determinazione del metodo più accurato. L'utilità del Ki-67 index nella formulazione di una prognosi nel linfoma è tutt'oggi dibattuta in letteratura, in parte anche a causa della mancanza di uniformità nei criteri di inclusione e nel metodo con cui il Ki-67 index è stato determinato nei vari studi (Kiupel *et al.*, 1999; Philips *et al.*, 2000; Sokolowska *et al.*, 2012). Nello studio di Kiupel *et al.*

del 2000, il Ki-67 era predittivo della durata dell'intervallo di recidiva ma non della sopravvivenza. Uno studio più recente focalizzato su cani con DLBCL trattati con un protocollo CHOP standardizzato ha invece riportato un tempo di sopravvivenza minore nei casi con più di 107 cellule positive al Ki-67 valutato tramite conta in griglie su preparati IHC (Sierra-Matiz *et al.*, 2018). Con la CF, lo studio di Poggi *et al.* riportava invece percentuali più alte sia della sopravvivenza che della remissione completa nei cani con valori intermedi di Ki-67 se comparati a quelli con valori alti e bassi di Ki-67 (Poggi *et al.*, 2017). In questo studio l'utilità prognostica del Ki-67 sia in IHC che in CF è stata confrontata in un gruppo di 21 casi con DLBCL e trattati con chemioterapia in modo da scongiurare potenziali errori legati all'istotipo ed al trattamento. Con entrambe le metodiche non è stata riscontrata nessuna associazione tra il Ki-67 index ed il PFI o il tempo di sopravvivenza, neanche tramite la stratificazione dell'indice di proliferazione nelle tre categorie proposte da Poggi *et al.* (2017). In maniera sovrapponibile non vi era nessuna associazione significativa tra la sopravvivenza e l'attività mitotica descritta da Valli *et al.* Questi riscontri, tuttavia, possono dipendere dal numero limitato dei casi incluso nell'analisi, per cui un gruppo più ampio di casi potrebbe condurre alle conclusioni definitive sull'importanza prognostica dell'attività proliferativa nel linfoma del cane.

Come già anticipato, uno dei maggiori limiti nella valutazione del valore prognostico del Ki-67 è con molta probabilità inerente all'assenza di uniformità nella valutazione della positività immunostochimica. L'attuale metodo standard prevede la conta manuale delle cellule positive in un'area nota o in griglie, e la positività può essere espressa sia come valore percentuale delle cellule positive sul totale delle cellule, oppure come valore assoluto. Sono però molti i limiti legati a questa metodica, sia legati all'operatore che intrinseci alla metodica, tra cui ad esempio la

soggettività nel riconoscimento della positività a causa della sovrapposizione delle cellule e delle diverse intensità di colorazione che le cellule positive possono assumere all'interno della stessa sezione, o la difficoltà di distinzione delle cellule neoplastiche da quelle linfoidi residue non neoplastiche, soprattutto nei linfomi follicolari. A complicare ulteriormente l'analisi sono poi eventuali artefatti della sezione, aree necrotiche e macrofagi a corpi tingibili. Inoltre, la conta manuale è dispendiosa sia in termini di tempo che di energia. In medicina umana sono stati proposti diversi metodi di conta automatici o semi-automatici basati su software di analisi d'immagine per poter sostituire la conta manuale, ma non è stato ancora raggiunto un accordo di standardizzazione (Kreipe, 2018). Nel presente studio, la conta manuale è stata effettuata dal medesimo operatore in via di ridurre gli errori di soggettività, e l'IHC è stata eseguita nello stesso laboratorio utilizzando un coloratore automatico. Inoltre, anche le immagini sono state scattate con gli stessi microscopio e telecamera, per ottenere immagini di qualità sovrapponibile.

In conclusione, questo studio preliminare ha evidenziato una correlazione tra i valori di Ki-67 index valutati con CF e IHC, ma diverse discrepanze sostanziali sono state osservate in alcuni casi isolati, non legate apparentemente alle caratteristiche tumorali. Ulteriori studi su un più ampio numero di casi sono necessari per confermare l'esistenza di eventuali differenze e per determinare quale delle due metodiche risulti più utile nel fornire indicazioni prognostiche di rilievo agli oncologi clinici.

**Tabella 2.3.** Lista degli anticorpi per citofluorimetria utilizzati nell'analisi di 32 aghi aspirati linfonodali di cane.

<b>Clone</b>	<b>Isotype</b>	<b>Fluorescence labelling</b>	<b>Target species / species cross-reactivity</b>	
<b>CD3</b>	CA17.2A12	mlgG1	FITC	anti-canine
<b>CD4</b>	YKIX302.9	rlgG2a	APC	anti-canine
<b>CD5</b>	YKIX322.3	rlgG2a	PerCP-eFLUOR® 710	anti-canine
<b>CD8</b>	YCATE 55.9	rlgG1	PE	anti-canine
<b>CD11a</b>	HI111	mlgG1	APC	anti-human, BD Pharmingen™ 559875
<b>CD21</b>	CA2.1D6	mlgG1	APC	anti-human, (unpublished data)
<b>CD79<math>\alpha</math>cy</b>	HM57	mlgG1	PE	anti-human (Mason <i>et al.</i> 1991)
<b>CD45</b>	YKIX716.13	rlgG2b	eFLUOR 450®	anti-canine
<b>MHCII</b>	YKIX334.2	rlgG2a	FITC	anti-canine
<b>CD34</b>	1H6	mlgG1	PE	anti-canine
<b>Ki-67</b>	B56	mlgG1	BV421	anti-human

Abbreviazioni: m = mouse; r = rat; FITC = fluorescein isothiocyanate; APC = allophycocyanin; PE = phycoerythrin.

**Tabella 2.4.** Differenze del Ki-67 index valutato sia attraverso citofluorimetria che immunohistochimica sulla base del pattern del linfoma ed il grado istologico.

Variabile	CF Ki-67 index <i>mediana (range)</i>	<i>P</i>	IHC Ki-67 index <i>mediana (range)</i>	<i>P</i>
<b>Pattern</b>		0.0033*		0.0040*
<i>nodulare</i>	7.2% (1.7-20.2%)		13.1% (7.5-28.5%)	
<i>diffuso</i>	49.6% (1.8-99.5%)		53.5% (12.7-86.3%)	
<b>Grado istologico<sup>a</sup></b>		0.0406*		0.0016*
<i>basso</i>	20.2% (1.7-61.5%)		13.5% (7.5-50.8%)	
<i>intermedio</i>	59.9% (16.3-98%)		52.2% (30.4-80.8%)	
<i>alto</i>	49.6% (1.8-99.5%)		56.9% (27.2-86.3%)	

\* = significativo; CF = citofluorimetria; IHC = immunohistochimica

<sup>a</sup> basato sul numero di mitosi secondo Valli *et al.*, 2011.

**Tabella 2.5.** Analisi dei fattori prognostici associati con intervallo di progressione libero da malattia e sopravvivenza complessiva in un gruppo di 21 cani con linfoma diffuso a grandi cellule trattato con chemioterapia.

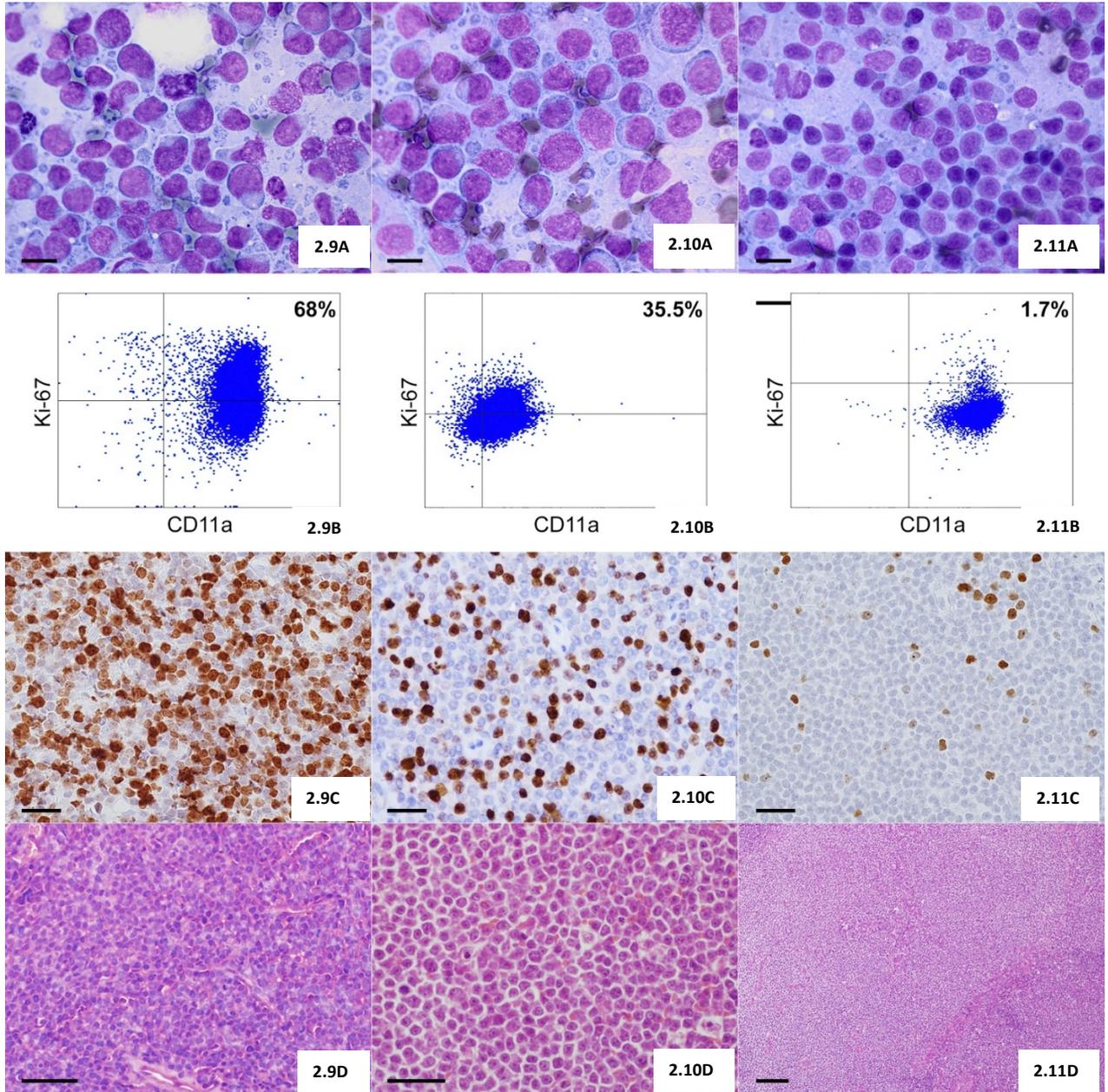
Variabile	Mediano PFI	P	Mediano OS	P
<b>Stadio clinico</b>		P = 0.007*		P = 0.0010*
<b>III/IV</b>	indefinito		indefinito	
<b>V</b>	93 giorni		168 giorni	
<b>Grado istologico<sup>a</sup></b>		P = 0.1794		P = 0.0543
<b>Basso/intermedio</b>	141		228	
<b>Alto</b>	338		indefinito	
<b>CF Ki-67 index<sup>b</sup></b>		0.3805		0.3111
<b>≤ 50.2%</b>	338		Non raggiunto	
<b>&gt; 50.2%</b>	195		218	
<b>IHC Ki-67 index<sup>a</sup></b>		0.5871		0.8708
<b>≤ 55.5%</b>	195		234	
<b>&gt; 55.5%</b>	not reached		Non raggiunto	

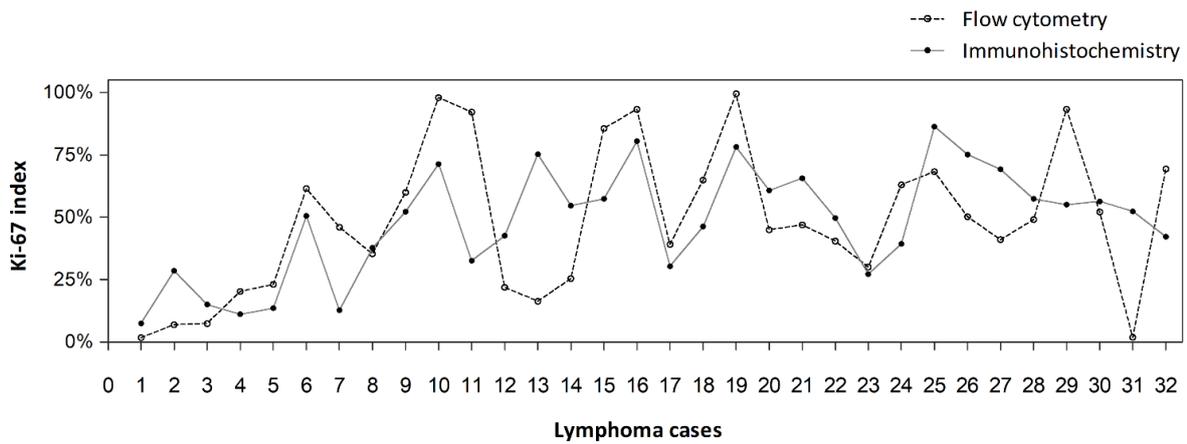
<sup>a</sup> basato sul numero di mitosi secondo Valli *et al.*, 2011.

<sup>b</sup> Valore mediano utilizzato come cut-off.

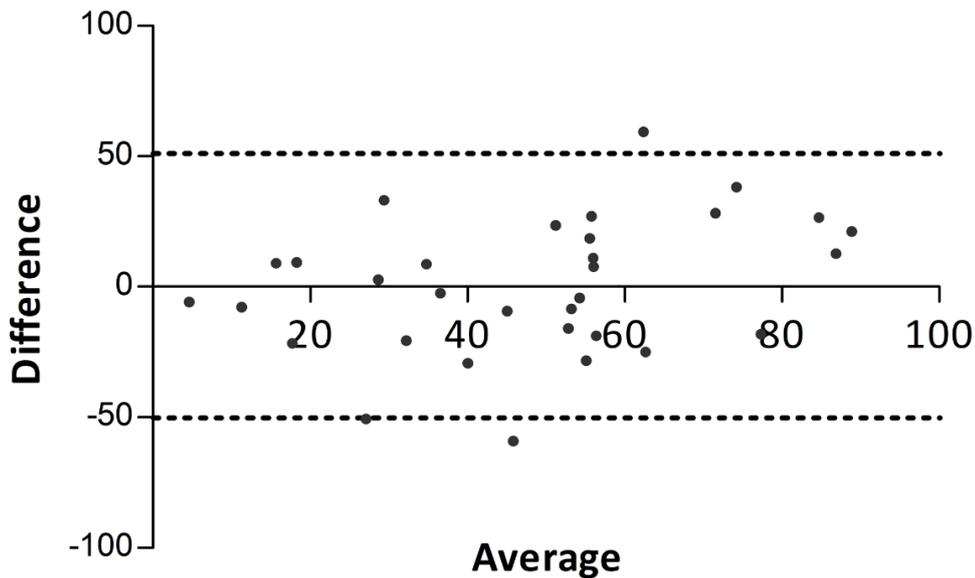
**Tabella 2.6.** Tasso di sopravvivenza d 6 mesi in un Gruppo di 21 cani con DLBCL trattati con chemioterapia raggruppati nei range di Ki-67 index proposti da Poggi *et al.*, 2017.

CF Ki-67 index	Tasso di sopravvivenza a 180 giorni	IHC Ki-67 index	Tasso di sopravvivenza a 180 giorni
<b>&lt;20%</b>	1/1 (100%)	<20%	1/2 (50%)
<b>20.1-40%</b>	3/4 (75%)	20.1-40%	3/3 (100%)
<b>&gt;40%</b>	9/13 (69%)	>40%	9/13 (69%)





2.12



2.13

**Figure 2.9-2.11.** Confronto tra citofluorimetria (1b, 2b, 3b) ed immunoistochimica (1c, 2c, 3c) nella valutazione del Ki-67 index. Esempi rappresentativi di livelli alti (2.9), intermedi (2.10) and bassi (2.11) di Ki-67 index. Vengono mostrati anche I corrispettivi preparati citologici (2.9a, 2.10A, 2.11A, Diff Quik stain) ed istologici (2.9D, 2.10D, 2.11d, HE stain). Bars: 2.9A, 2.10A, 2.11A = 25  $\mu$ m; 2.9C, 2.10C, 2.11D, 2.11 c = 50  $\mu$ m; 2.9D, 2.11D = 100  $\mu$ m.

**Figura 2-12.** Dot plot che mostra le misurazioni del Ki-67 con citofluorimetria ed immunoistochimica in 32 casi di linfoma nodale canino in modo appaiato.

**Figura 2.13.** Bland-Altman plot che mostra la concordanza tra la citofluorimetria e l'immunoistochimica nella valutazione del Ki-67 index nei 32 casi di linfoma nodale canino.

*NOTICE: this is the author's version of a work that was submitted for publication on international journal. Changes resulting from the publishing process, such as editing, corrections, structural formatting, and other quality control mechanisms may not be reflected in this document. Changes may have been made to this work since it was submitted for publication. A definitive version will be published in: Rigillo A, Fuchs-Baumgartinger A, Sabattini S, Škor O, Agnoli C, Bettini G, Schwendenwein, Rütgen B. "Agreement between immunohistochemistry and flow cytometry in the assessment of Ki-67 index in canine lymphoma"- Submitted October 2019.*

*Parte III*

**L'analisi delle metilazioni del DNA**

## Capitolo V

### L'analisi delle metilazioni del DNA in oncologia

Anche prima che il DNA venisse identificato come la molecola dell'ereditarietà, gli scienziati sapevano che non tutti i geni di un organismo possono essere attivi in ogni cellula allo stesso momento. Anche così, tuttavia, tutte le cellule di un organismo condividono le stesse informazioni genetiche. Conrad Waddington coniò il termine "*panorama epigenetico*" (Esteller, 2008; Waddington, 1939) per quei meccanismi molecolari che convertono l'informazione genetica in tratti osservabili o *fenotipi*. In molti casi, i pattern epigenetici di espressione genica e i fenotipi associati persistono attraverso la mitosi e persino la meiosi, nonostante non avvenga nessuna modificazione nella sequenza di DNA primaria. Di conseguenza, l'epigenetica viene compresa come lo studio dei meccanismi che controllano l'espressione genica in una maniera potenzialmente ereditabile (Portela e Esteller, 2010).

L'avanzamento nella comprensione dei meccanismi che stanno alla base dei fenomeni epigenetici e il loro contributo allo sviluppo di patologie nell'uomo ha condotto ad un interesse particolarmente acceso nella ricerca epigenetica.

Da un punto di vista molecolare, le modificazioni covalenti delle basi di citosina e degli istoni, e i cambiamenti nella posizione dei nucleosomi, sono comunemente considerati i meccanismi epigenetici principali. Per semplificazione, le modificazioni epigenetiche possono essere raggruppate in tre categorie principali: le metilazioni del DNA, le modificazioni a carico delle proteine istoniche e i posizionamenti dei nucleosomi (Portela e Esteller, 2010).

### 5.1 Le basi molecolari della metilazione del DNA

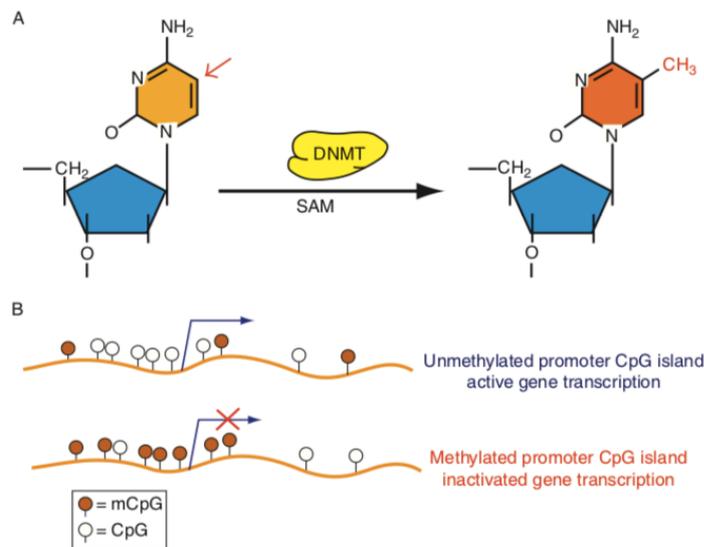
La propagazione della metilazione del DNA consiste nell'aggiunta covalente di un gruppo metile ( $-CH_3$ ) che può avvenire esclusivamente sull'estremità 5' della citosina. La citosina può essere così convertita a *5-idrossimetilcitosina (hmC)*, che è strutturalmente simile alla sua controparte non modificata (Tahiliani *et al.*, 2009). Le *5-metilcitosine* si osservano soprattutto all'interno dei dinucleotidi CpG (Citosina-fosfato-Guanina). Le metilazioni non-CpG sono poco comuni e rilevate principalmente all'interno dei dinucleotidi CpA (Citosina-fosfato-Adenina) ed in misura minore nei CpT (Citosina-fosfato-Timina), rispettivamente nelle cellule embrionali ma non nei tessuti somatici (Ramsahoye *et al.*, 2000). La metilazione della citosina nelle CHG e CHH (dove H = A, T o C) sono state riscontrate esclusivamente nelle cellule staminali che sembrerebbero perdere le metilazioni non-CpG durante la loro differenziazione; per questo motivo, le metilazioni non-CpG potrebbero essere legate al mantenimento dello stato pluripotente della cellula (Lister *et al.*, 2009). Al contrario di quanto immaginabile, l'intero genoma è caratterizzato da un contenuto piuttosto basso di CpG. Questi dinucleotidi sono concentrati tipicamente in ampi clusters definiti "isole CpG" (CpG islands – CGIs) che sono presenti principalmente nelle regioni promoter e/o sul primo esone del gene. Secondo un calcolo della prevalenza delle CpG, circa il 60% delle regioni promoters dell'uomo sono caratterizzate da un elevato contenuto di CpG, che sono a loro volta costituite per circa il 55% da Citosina e Guanina, e da una dimensione minima di 200 paia di basi (bp) (Takai and Jones, 2002; Saxonov *et al.*, 2006). La densità delle CpG, tuttavia, non influenza l'espressione genica. Questa regolazione dipende solamente dal processo di metilazione; normalmente, le CGIs

sono non metilate nei geni trascrizionalmente attivi, mentre i geni silenziati sono caratterizzati dalla metilazione all'interno della regione promoter.

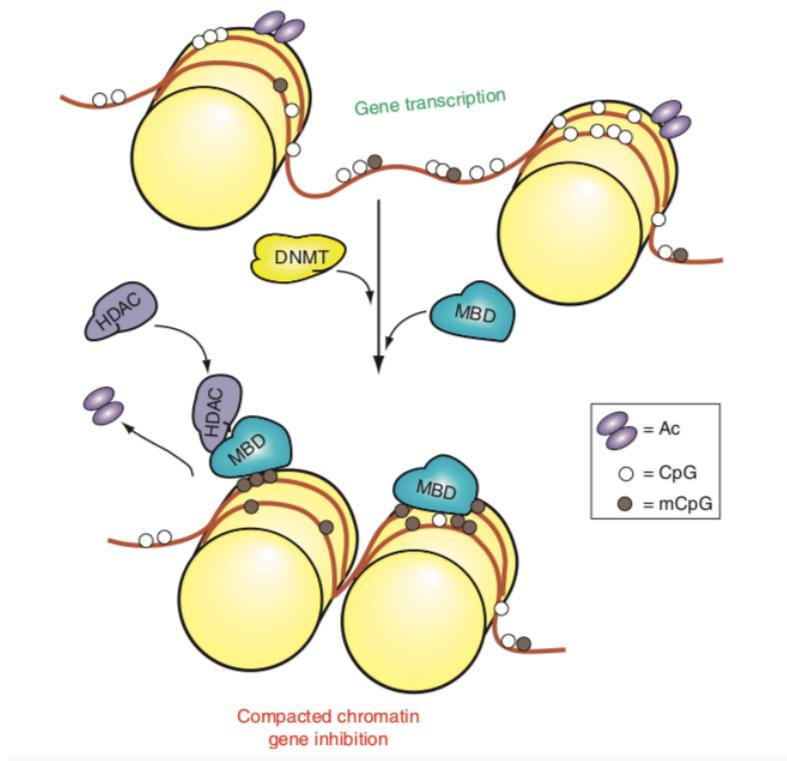
La reazione di metilazione della citosina è mediata da una classe di enzimi chiamata *DNA metiltransferasi (DNMT)*, che catalizza il trasferimento del gruppo metile da *S-adenosil-metionina* sulla citosina (Figura 3.1). Nei mammiferi sono stati identificati 5 membri di questa famiglia di enzimi: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L, tuttavia, soltanto DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L interagiscono nella produzione del pattern globale della metilazione della citosina. Queste proteine, codificate in maniera indipendente, vengono classificate come enzimi *de novo* (DNMT3a, DNMT3b) o di mantenimento (DNMT1) delle metilazioni. DNMT2 e DNMT3L non sembrano avere attività metiltransferasica verso la citosina; è stato dimostrato che la DNMT3L stimola la metilazione *de novo* tramite DNMT3a, e media la repressione trascrizionale mediante interazione con la istone-deacetilasi-1 (Chedin *et al.*, 2002; Deplus *et al.*, 2002). DNMT1 è coinvolta nel ripristino del pattern di metilazione di DNA parentale nella nuova catena di DNA sintetizzata, assicurando così lo stato di metilazione delle CGI attraverso generazioni cellulari multiple. La DNMT1 mostra una preferenza di substrati emimetilati e possiede un dominio che ha come target le forcelle di replicazione. A dimostrazione dell'importanza di questo enzima, è da menzionare il fatto che la perdita funzionale di DNMT1 porta letalità embrionale nei topi (Li *et al.*, 1992).

In linea generale, la metilazione delle CGI è associata al silenziamento genico. La metilazione del DNA gioca un ruolo chiave nell'imprinting genomico, dove le metilazioni su uno dei due alleli parentali conduce all'espressione monoallelica (Kacem e Feil, 2009); un simile dosaggio genico è anche osservabile nell'inattivazione del cromosoma X nelle femmine (Reik e Lewis, 2005).

La metilazione del DNA può inibire l'espressione genica mediante diversi meccanismi. Il DNA metilato può promuovere il reclutamento delle proteine *metil-CpG-binding (MBD)*, le quali a loro volta attivano i complessi in grado di modificare gli istoni e di rimodellare la cromatina a livello dei siti metilati (Esteller, 2007; Lopez-Serra e Esteller, 2008) (Figura 3.2). La metilazione del DNA è anche in grado di inibire direttamente la trascrizione precludendo il reclutamento delle proteine leganti il DNA a partire dai loro siti target (Kuroda *et al.*, 2009). Al contrario, le CGI non metilate creano una struttura della cromatina favorevole all'espressione genica reclutando *Cfp1*, che si associa all'istone-metiltransferasi *Setd1* creando domini ricchi del marker di metilazione istonica *H3K4-trimetilazione* (Thomson *et al.*, 2010).



**Figura 3.1.** Metilazione della citosina. (A) Metilazione alla posizione 5' della molecola di citosina, catalizzata dalla DNMT in presenza di *S-adenosil-metionina* (SAM). (B) CpG non metilate all'interno della regione promoter non inibiscono la trascrizione ed il gene viene espresso. Quando avviene la metilazione delle CpG all'interno delle regioni regolatrici, il gene viene silenziato. *Fonte: Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010; 70:27-56.*



**Figura 3.2.** Meccanismo di silenziamento genico mediato dalla metilazione del DNA. La metilazione del DNA è seguita dall'associazione di proteine *metil-CpG-binding* (MBD) che, a turno, reclutano la *istone deacetilasi* (HDAC). Come conseguenza, la cromatina viene compattata e la trascrizione genica viene inibita. *Fonte: Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010; 70:27-56.*

## 5.2 Anomalie nella metilazione del DNA nelle neoplasie

L'appropriata metilazione del DNA è fondamentale per lo sviluppo ed il funzionamento specifico cellulare, per cui ogni anomalia in questo processo può condurre a patologie di vario genere, incluso il cancro. Le cellule tumorali, infatti, sono caratterizzate da un *metiloma* differente da quello delle cellule normali. È interessante notare come, in corso di tumore, siano osservabili eventi sia ipo- che ipermetilanti. In generale, si osserva una diminuzione globale del contenuto CpG metilato. Questo fenomeno contribuisce all'instabilità genomica e, meno frequentemente, all'attivazione di oncogeni silenziati. L'ipermetilazione delle CGI a livello di regioni promoter di specifici geni, dall'altro canto, è stato dimostrato essere un *hallmark* critico in molte cellule tumorali (Paz *et al.*, 2003), con l'identificazione di un numero sempre maggiore di geni inattivati dai meccanismi di metilazione del DNA durante la cancerogenesi, e che nei tessuti normali agirebbero come soppressori tumorali. Non è da trascurare, inoltre, il fatto che molte delle attuali ipotesi sottolineino l'importanza delle modificazioni epigenetiche negli stadi tumorali precoci e persino nella predisposizione alla patologia neoplastica. È stata infatti avanzata l'ipotesi che i fenomeni di disequilibrio epigenetico, rilevabili prima delle mutazioni geniche, siano gli eventi iniziativi che conducono poi alla formazione delle "cellule tumorali progenitrici" (Feinberg *et al.*, 2006).

### *L'ipometilazione del DNA*

In una cellula normale, l'eterocromatina pericentromerica è altamente metilata. Le sequenze *satellite*, sequenze ripetitive genomiche, sono silenziate in maniera da assicurare stabilità ed integrità al genoma. In un'ampia varietà di tumori, tuttavia, questi meccanismi sono irregolari e può verificarsi la perdita della metilazione delle regioni normalmente silenziate. Di

conseguenza è presente un'elevata possibilità di ricombinazioni mitotiche indesiderate. Gli elementi trasponibili sono così riattivati e possono integrarsi in siti random del genoma, portando alla mutagenesi e all'instabilità genomica; ciò può essere correlato allo sviluppo tumorale ed associato a diversi stadi della malattia.

La perdita della metilazione del DNA è anche in grado di attivare sequenze virali latenti incorporate nel genoma, che possono condurre ad una progressione tumorale. Ad esempio, il genoma del papillomavirus genitale umano (HPV) è represso in maniera efficiente dalle metilazioni CpG dopo l'infezione. I fenomeni di ipometilazione del DNA consentono ad HPV la riespressione, che può accompagnare allo sviluppo del tumore cervicale (Badal *et al.*, 2003). La latenza del virus Epstein-Barr, uno dei virus conosciuti e associati a diversi linfomi, sembrerebbe anch'essa essere controllata da eventi epigenetici (Takacs *et al.*, 2010).

In base alle funzioni del gene affetto da ipometilazione, questo fenomeno può essere collegato a diversi stadi dell'oncogenesi. La perdita delle metilazioni nel promoter del gene *CDH3*, ad esempio, risulta in una sovraespressione della Caderina-P nel tumore coloretale e mammario; di conseguenza, la diminuita polarità cellulare promuove l'invasione, la motilità e la migrazione cellulari, e si associano quindi ad una prognosi peggiore del paziente (Milicic *et al.*, 2008; Paredes *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2010).

Non è stata documentata, nonostante la perdita delle metilazioni del genoma, la presenza di alcun enzima demetilante, né tantomeno nessuna evidente riduzione nell'attività delle DNMT, bensì, al contrario, è stata riportata una loro sovraespressione (Ahluwalia *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007; Roll *et al.*, 2008).

### *L'ipermetilazione del DNA*

Nelle neoplasie, nonostante la generale ipometilazione, alcuni geni vanno incontro ad inattivazione come conseguenza dell'ipermetilazione delle CGI nelle regioni di regolazione che sono non metilate nei tessuti normali. Questo tipo di silenziamento epigenetico è stato dimostrato per la prima volta negli studi sul retinoblastoma, in cui è presente una ipermetilazione del gene oncosoppressore del retinoblastoma (*RB1*) (Greger *et al.*, 1989). È da sottolineare come, nonostante ci sia una categoria di geni che sono ipermetilati in diversi tipi di tumore, numerosi studi hanno mostrato come la metilazione delle regioni promoter sia tumore-specifica, per cui ogni tumore può essere definito mediante uno specifico "metiloma". Inoltre, diversi pattern di metilazione possono riflettere lo stadio di oncogenesi o addirittura permettere la distinzione tra diversi tipi istologici. Secondo la maggior parte dei dati riportati, le metilazioni dei geni che vengono silenziati nei tumori avvengono nelle CGI promotrici e nelle regioni regolatrici, ma in alcuni studi l'inibizione dell'espressione genica è stata riscontrata anche nelle regioni non-CGI (Futscher *et al.*, 2002; Veerla *et al.*, 2008).

Le ipermetilazioni del DNA possono essere impiegati in modo efficace come *biomarker* tumorali (Mulero-Navarro e Esteller, 2008). Come già detto, geni specifici possono essere metilati a stadi differenti dello sviluppo tumorale. Le metilazioni possono servire sia per rilevare stati pre-maligni di una patologia, sia per valutare il rischio di progressione a lesione maligna. Queste informazioni possono risultare cruciali nella scelta del trattamento corretto per i pazienti, per evitare l'utilizzo di terapie più aggressive quando non necessario. Le anomalie di metilazione possono avvenire in stadi molto precoci della neoplasia o possono addirittura colpire geni che non sono direttamente legati all'oncogenesi, ma che vanno a conferire, tuttavia, un "fenotipo mutatore".

Uno dei grandi vantaggi di utilizzare le metilazioni del DNA come biomarker è la facilità con cui possono essere rilevate ed analizzate; infatti le regioni che possono essere soggette a eventi di metilazione sono ben definite. In confronto, le mutazioni che inattivano i geni oncosoppressori sono normalmente distribuite in diversi siti lungo la sequenza, richiedendo analisi più complesse per verificare la loro presenza. Inoltre, dal momento che il DNA può essere rilasciato dalle cellule tumorali, i geni metilati possono essere esaminati anche dai fluidi biologici (Wong *et al.*, 2001). L'identificazione di biomarker basati sul DNA metilato in campioni come saliva, plasma, siero o urina ottenute in maniera non invasiva sono fonti promettenti di diagnosi precoce dei carcinomi.

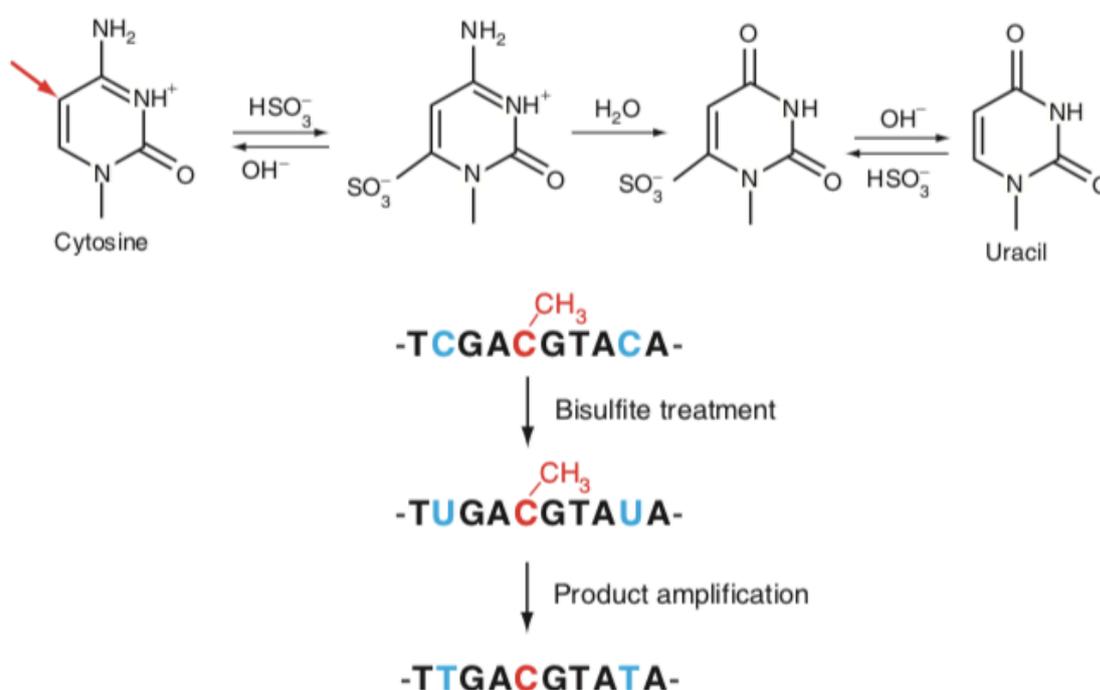
### 5.3 Tecniche di determinazione del *Metiloma Genomico Tumorale*

Le 5-metilcitosine possono essere rilevate mediante tre possibili metodi basati su:

- a. La conversione del DNA con bisolfito
- b. Enzimi di restrizione metil-sensibili
- c. Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Il trattamento con bisolfito ha il vantaggio che la citosina metilata diventi meno reattiva, per cui il trattamento del DNA con bisolfito converte solamente le citosine non metilate ad uracile, mentre i nucleotidi metilati restano invariati (Figura 3.3). Successivamente, il pattern di metilazione di determinate CpG può essere rilevato mediante PCR specifiche per metilazioni (MSP) con primers specifici complementari sia al prodotto originale metilato che a quello non metilato (Herman e Baylin, 2001). La MSP è il metodo più semplice e rapido per analizzare le metilazioni del DNA in un elevato numero di campioni nelle pratiche di laboratorio quotidiane. Per valutare lo stato di metilazione del DNA di CpG multiple (ad esempio all'interno di una regione promoter), il sequenziamento del frammento amplificato può essere eseguito dopo

la conversione con bisolfito (*bisulfite sequencing PCR, BSP*). La combinazione del trattamento con bisolfito e la PCR quantitativa specifica per metilazioni (conosciuta anche come *MethyLight*) o con *pyrosequencing* (una tecnica che rileva le modificazioni a carico del singolo nucleotide) forniscono informazioni sulle minime alterazioni della metilazione del DNA (Eads *et al.*, 2000; Uhlmann *et al.*, 2002).



**Figura 3.3.** Conversione del DNA con bisolfito. La reazione di trattamento con bisolfito converte le citosine ad uracile. La metilazione nella posizione 5' dell'anello citosinico (freccia rossa) protegge il composto dalla conversione. Dopo il trattamento con bisolfito, seguito dall'amplificazione del prodotto, le citosine non metilate sono convertite a timidina, mentre i nucleotidi metilati rimangono invariati. *Fonte: Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet. 2010; 70:27-56.*

Un altro approccio per la rilevazione delle citosine metilate è basato su *enzimi di restrizione metil-sensibili* che possono digerire la sequenza target solo se non metilata. Le analisi in cui vengono coinvolti questi enzimi possono spesso essere utilizzate per valutare lo status di metilazione globale. Tuttavia, uno dei più significativi svantaggi di questa strategia è la sua limitazione a riconoscere solo quelle CpG localizzate nel sito di restrizione dell'enzima. La densità delle CpG può inoltre ostacolare l'analisi corretta.

Uno dei primi metodi applicati agli studi di metilazione complessiva del genoma è stato lo scanning genomico "*restriction landmark*" (RLGS) (Rush e Plass, 2002) in cui i campioni di DNA di, ad esempio, tessuto tumorale e tessuto normale vengono digeriti da un enzima di restrizione metil-sensibile. I frammenti di DNA vengono marcati a livello dei siti di restrizione con dei radionucleotidi. Successivamente, viene effettuata l'elettroforesi, seguita poi da una seconda digestione, stavolta con un enzima a maggiore frequenza di digestione nucleotidica. I frammenti di DNA ottenuti in questo modo vengono separati mediante elettroforesi. Come risultato, viene prodotta un'immagine dei punti marcati che corrisponde ai siti non metilati. L'analisi delle differenze nella distribuzione dei punti tra i due campioni fornisce informazioni riguardo i cambiamenti nel pattern di metilazione, ed il segnale di questi punti è correlato alla quantificazione del numero di copie del gene.

Il primo step di un altro metodo, *l'analisi della differenza rappresentativa metilazione-sensibile*, richiede allo stesso modo la digestione dei campioni di DNA che devono essere comparati da parte di enzimi metil-sensibili (Kaneda *et al.*, 2003). A differenza della RLGS, gli ampliconi non vengono marcati, ma legati a piccoli frammenti di DNA (conosciuti come adattatori universali) che contengono una sporgenza complementare ai siti di restrizione. I

prodotti vengono quindi amplificati, ottenendo delle librerie dei prodotti dei siti non metilati come screening.

Il terzo modo per distinguere le citosine metilate da quelle non metilate è legato al *ChIP*. Ad esempio, l'uso di specifici anticorpi diretti verso le proteine *MBD* consente ai frammenti di DNA metilati di immunoprecipitare ed essere quindi sottoposti ad ulteriori analisi che ne consentano l'identificazione (Ballestar *et al.*, 2003; Lopez-Serra *et al.*, 2006).

La combinazione del metodo ChIP con l'ibridazione del DNA fornisce informazioni riguardo lo status di metilazione su larga scala. Lo sviluppo di anticorpi contro le 5-metilcitosine, inoltre, introduce l'opportunità di identificare CpG multiple e distinte nel genoma quando viene combinato con l'analisi di *DNA microarray* (Me-DIP strategy; Weber *et al.*, 2005). La tecnologia microarray, infatti, è un importante strumento per l'analisi della metilazione globale del DNA.

#### **5.4 Il carcinoma squamocellulare di testa e collo dell'uomo**

Il carcinoma squamocellulare di testa e collo (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - HNSCC*) è il sesto tumore universalmente più diffuso con una incidenza annuale mondiale di 600.000 nuovi casi, per lo più diagnosticati come patologie locali in stadio avanzato (Siegel *et al.*, 2016). Questo carcinoma è una patologia eterogenea sia a livello clinico che molecolare, che comprende diversi tumori dell'ipofaringe, orofaringe, labbro, cavità orale, nasofaringe e laringe. Questo gruppo di tumori presenta un'epidemiologia, un'eziologia e alterazioni molecolari differenti che guidano la carcinogenesi e conseguentemente risposte diverse alle terapie. I fattori di rischio tradizionalmente attribuiti alla patogenesi del HNSCC sono il fumo e l'eccessivo consumo di alcol, pur essendo anche i papillomavirus umani ad alto rischio (HPVs) associati ad un numero sempre maggiore di questi tumori, soprattutto nell'orofaringe e nei pazienti più giovani (Leemans *et al.*, 2018).

Il tasso di sopravvivenza mediano a cinque anni è rimasto praticamente invariato negli ultimi decenni, restando attorno al 50% pur di fronte ad implementazioni dei trattamenti (chirurgico, radioterapico, chemioterapico e con terapie a nuovi target), principalmente per lo stadio clinico avanzato al momento della diagnosi e lo scarso successo dei trattamenti associati a ricorrenza frequente (Marur *et al.*, 2016). La terapia del HNSCC si basa su alcuni parametri clinico-patologici come la localizzazione anatomica del tumore e lo stadio; tuttavia, pazienti con caratteristiche clinico-patologiche simili possono differire nell'outcome clinico, spiegando così l'eterogeneità del tumore (Ribero *et al.*, 2016). Una migliore comprensione della biologia molecolare dell'HNSCC potrebbe avere importanti ripercussioni pratiche nella gestione dei pazienti e nella medicina di precisione verso questi tumori. Il relativamente recente avvento delle tecnologie ad alte prestazioni e il conseguente approccio molecolare integrativo a più livelli è promettente nella stratificazione dei pazienti con HNSCC in sottogruppi sulla base dei loro profili clinici e molecolari, identificando markers di diagnosi e di prognosi che consentano di selezionare target terapeutici adeguati ed il disegno di strategie di trattamento personalizzate. Inoltre i programmi di screening non invasivi di questi biomarker nei fluidi corporei in pazienti ad alto rischio come fumatori e dipendenti da alcol, così come il monitoraggio della malattia residua, della recidiva o delle metastasi in pazienti dopo e durante il trattamento, potrebbero migliorare la diagnosi precoce con interventi curativi efficaci e preservazione della qualità della vita (Ribero *et al.*, 2016).

### **5.5 La cancerizzazione di campo e le alterazioni genomiche nel tumore di testa e collo**

Il tumore di testa e collo deriva da alterazioni genetiche ed epigenetiche multiple cumulative che portano sequenzialmente alla trasformazione di una cellula normale in una neoplastica. Il concetto di "cancerizzazione di campo" è stato introdotto per la prima volta da Slaughter *et*

*al.* (1953), descrivendo tessuto istologicamente anormale circostante il carcinoma squamocellulare orale, che poteva spiegare il frequente sviluppo, l'elevata presenza di tumori primari multipli e la recidiva locale nei pazienti HPV-negativi, mentre per quelli HPV-positivi il concetto della cancerizzazione di campo necessita ancora di ulteriori chiarimenti. L'avvento dell'era genomica può adiuvarne nella rivelazione delle basi genetiche di questi campi alterati e nell'identificazione di modelli di progressione biologica in cui lo sviluppo di un campo con cellule geneticamente alterate giochi un ruolo centrale nel processo cancerogenico selettivo (Braakhuis *et al.*, 2003). Il primo modello genetico di HNSCC fu descritto da Califano *et al.* (Califano *et al.*, 1996), in cui le perdite a livello delle regioni cromosomiche *3p*, *9p*, e *17p* erano considerate eventi precoci nel processo cancerogenico. Le alterazioni molecolari possono avvenire, tuttavia, prima di quelle fenotipiche, avvalorando il potenziale della rilevazione delle alterazioni molecolari per diagnosticare l'HNSCC precocemente, e per monitorare lesioni potenzialmente maligne predicendo il comportamento della patologia e la sua progressione. L'evoluzione metodologica dalla Citogenetica Convenzionale alla Ibridazione Genomica Comparativa (CGH), al Polimorfismo del Singolo Nucleotide (SNP-array) fino alla Next Generation Sequencing (NGS) ha condotto alla caratterizzazione numerica e strutturale delle alterazioni genomiche e dello spettro mutazionale degli HNSCC. In questi tumori sono state descritte alterazioni in quasi tutti i cromosomi, seppur alcune regioni cromosomiche e geni sono riportati con maggior frequenza in letteratura (Ribero *et al.*, 2016); ad esempio, *copy number gains* a livello di *3q*, *6p*, *8q*, *11q*, *16p*, *16q*, *17p*, *17q* e *19q* e *copy number losses* a livello di *2q*, *3p*, *4q*, *5q*, *8p*, *9p*, *11q* e *18q* (Ribero *et al.*, 2014; Ribero *et al.*, 2014; Cancer Genome Atlas, 2015; Ribero *et al.*, 2016a; Ribero *et al.*, 2016b; Ribero *et al.*, 2017; Ribero *et al.*, 2018). Numerosi *signalling pathways* e numerosi componenti dei pathway principali sono

inoltre noti per essere irregolari o interrotti negli HNSCC, come ad esempio il segnale del recettore per il fattore di crescita epiteliale (*epidermal growth factor receptor – EGFR*), il pathway del *fosfatidilinositolo-3-chinasi/protein kinasi B (PI3-K/Akt)*, il pathway di trasduzione del segnale, il target mammifero della rapamicina (*mTOR*), *nuclear factor-kB (NF-kB)*, fattori di trascrizione e la heat shock protein 90 (Hsp90) (Stadler *et al.*, 2008). Nonostante queste conoscenze sempre più specifiche, la diagnostica molecolare clinica degli HNSCC è ancora poco sviluppata, con il cetuximab come sola opzione terapeutica target, e allo stato attuale i test molecolari non hanno pressoché nessun impatto nella prognosi e nella predizione della risposta alla terapia (Stadler *et al.*, 2008). Questo scenario potrebbe essere rivoluzionato grazie all'integrazione dei dati molecolari e clinico-patologici nei processi diagnostici e terapeutici, insieme all'utilizzo dei biomarker circolanti per il monitoraggio dei pazienti e della popolazione a rischio.

## 5.6 Fluidi corporei per la rilevazione dei biomarker circolanti di HNSCC

### *Sangue periferico*

Un esame del sangue è un approccio minimamente invasivo che può essere ripetuto in diversi tempi durante il trattamento del paziente e il follow-up, essendo il sangue una matrice idonea per il recupero di DNA ed RNA e quindi per rilevare marker molecolari circolanti. Il sangue periferico, sia plasma che siero, contiene acidi nucleici circolanti utili come “biopsie liquide” per applicazioni diagnostiche e di monitoraggio. Ad oggi ci sono numerosi studi che utilizzano approcci differenti rispetto alle biopsie liquide negli HNSCC. La concentrazione totale del *DNA tumorale circolante (ctDNA)*, indipendentemente dall'analisi genetica ed epigenetica del ctDNA, può essere utilizzato come marker diagnostico e prognostico; l'importanza

dell'aumento del ctDNA nei pazienti con tumore rimane tuttavia dibattuta (Payne *et al.*, 2018). Mazurek *et al.* (2016) hanno analizzato i livelli di *DNA circolante libero (cfDNA)* in 2000 pazienti affetti da HNSCC ed hanno verificato livelli più elevati del cfDNA totale in pazienti con carcinoma squamocellulare orofaringeo rispetto ad altri HNSCC; inoltre, il livello di cfDNA nei pazienti con linfonodo regionale metastatico (N2-N3) era più elevato rispetto ai pazienti con linfonodo regionale N0-N1, così come in quelli con stadio clinico IV rispetto a quelli con stadio clinico I-III (Mazurek *et al.* 2016) Allo stesso modo, la frequenza di rilevazioni delle cellule tumorali circolanti (CTC) di HNSCC sembra dipendente dallo stadio TNM. Kawada *et al.* (2017) hanno rilevato e quantificato le CTC in 32 pazienti con HNSCC e hanno verificato che i pazienti con una patologia più avanzata avevano un maggior numero di CTC, ma lo stadio clinico linfonodale (N) non era correlato a questa quantificazione. In generale, il rilevamento delle CTC nel sangue periferico è associato ad una prognosi peggiore, e sono disponibili diversi test di quantificazione specifici per i diversi tumori.

Gli HNSCC sono caratterizzati da alcune alterazioni genetiche ed epigenetiche precoci, di cui molte esplorabili nel circolo ematico. La metilazione del *CDKN2A*, *MGMT*, *GSTP1* e *DAPK1* è stata testata nel tessuto e nel siero di HNSCC, con la metilazione di *DAPK1* correlata alla metastasi linfonodale e alla malattia avanzata (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2000). Schrök *et al.* (2017) hanno dimostrato che i livelli quantitativi di metilazione in *SEPT9* e *SHOX2* nel cfDNA da plasma potrebbero essere biomarker per la diagnosi, lo staging molecolare, la prognosi e il monitoraggio post-terapeutico nei pazienti con HNSCC.

Anche numerosi microRNA (miRNA) circolanti sono stati investigati come biomarker diagnostici e prognostici nell'HNSCC. I miRNA sono molecole di cfRNA abbondantemente presenti nel sangue e sembrerebbero associati al tumore solido da cui originano (Mitchell *et*

*al.*, 2008; Clancy *et al.*, 2015). Hsu *et al.* (2012) hanno verificato l'espressione di dieci miRNA tra cui *let-7a*, *miR-21*, *miR-26b*, *miR-34c*, *miR-99a*, *miR-133a*, *miR-137*, *miR-184*, *miR-194a*, e *miR375* nel plasma di 50 pazienti con HSCC utilizzando la real-time PCR, suggerendo che la rilevazione di *miR-21* e *miR-26b* circolanti pre- e post-operatori possa essere un marker di prognosi del HNSCC, essendo i loro livelli post-operatori ridotti nei pazienti con buona prognosi. Nei pazienti con tumore orale e lesioni con potenziale maligno, i livelli plasmatici di *miR-196a* e *miR-196b* erano significativamente più elevati rispetto ai controlli, rendendo la rilevazione combinata di questi due miRNA potenziali biomarker per la diagnosi precoce di tumore orale (Lu *et al.*, 2015). La *upregulation* di *miR-181* è stata rilevata sia nel plasma che nel tessuto tumorale ed è stata associata alla progressione della leucoplachia a tumore orale invasivo, allo sviluppo di metastasi linfonodali, all'invasione vascolare e ad una bassa sopravvivenza (Yang *et al.* 2011).

Nel siero di pazienti affetti da HNSCC è stata inoltre descritta la presenza di microvescicole, ma il loro ruolo è ancora in gran parte da chiarire. Le vescicole extracellulari derivanti dai tumori presenti nel siero di pazienti con HNSCC sembrano giocare un ruolo nell'evasione della morte cellulare tumorale, essendo responsabili della morte dei linfociti T CD8+ nella circolazione periferica, probabilmente per la presenza di *FasL* (un membro della famiglia del tumor necrosis factor – TNF) sulle vescicole (Kim *et al.*, 2005). Ulteriori indagini sul contenuto delle microvescicole e degli esosomi sarebbero vantaggiose per l'identificazione di biomarker per la progressione e l'outcome degli HNSCC.

Van Ginkel *et al.* (2017) hanno proposto una sequenza applicativa per l'utilizzo delle biopsie liquide nella sorveglianza locoregionale dei pazienti HNSCC a seguito del trattamento, ma sono

necessari, ulteriori studi per identificare, quantificare e analizzare a livello molecolare il ctDNA e/o le CTC in un numero maggiore di casi di HNSCC.

### *Saliva*

La saliva è il fluido biologico maggiormente analizzato per la rilevazione del cancro orale, poiché presenta diversi vantaggi: è accessibile in maniera non invasiva, presenta basse contaminazioni di materiale normale (cellule, DNA, RNA e proteine) e di sostanze inibitorie con complessità minori rispetto a quelle ematiche (Zimmermann *et al.*, 2007); inoltre, l'uso della saliva può risultare più vantaggioso rispetto a quello delle cellule esfoliate, poiché alcune localizzazioni dei tumori di testa e collo non consentono un accesso facile per effettuare un tampone. I campioni di saliva sono considerati molto importanti per la ricerca di biomarker precoci per il diretto contatto con le lesioni maligne o potenzialmente maligne, soprattutto nel caso dei tumori orali. Esistono diverse metodiche per la raccolta di saliva con o senza stimolazioni che possano influenzare la concentrazione degli analiti presenti. Nonostante le caratteristiche non invasive del prelievo di saliva, il suo potere diagnostico sembra al momento limitato alle patologie orali, mentre la sua applicazione clinica per patologie sistemiche non è ancora riconosciuta (Majem *et al.*, 2015). È interessante notare come la sensibilità di rilevazione di DNA derivante dal tumore sembri essere dipendente dalla sede, e quindi più efficiente per i tumori della cavità orale, mentre per i tumori in altre localizzazioni della regione testa-collo, il plasma sembra essere preferibile, in quanto maggiormente arricchito di DNA (Wang *et al.*, 2015).

Perdomo *et al.* (2017) hanno trovato una bassa concordanza nelle mutazioni di *TP53* rilevate tra tessuto di HNSCC, risciacqui orali e campioni di plasma. Sethi *et al.* (2009) hanno identificato nella saliva una firma genetica distinta, che comprendeva alterazioni nei geni

*PMAIP1* e *PTPN1* che differenziavano pazienti con HNSCC da quelli controllo. Spafford *et al.* (2001) hanno utilizzato l'analisi dei microsatelliti (sequenze ripetute di DNA non codificante costituiti da unità di ripetizione molto corte disposte secondo una ripetizione in tandem) per rilevare alterazioni genetiche tumore-specifiche in campioni di cellule esfoliate della mucosa orale in pazienti con HNSCC e hanno verificato che l'instabilità dei microsatelliti era rilevabile nella saliva del 96% dei casi in cui era presente la neoplasia.

Per quanto riguarda il campo epigenetico, sono stati rilevati *pattern* alterati di ipermetilazione delle regioni promoter sia nei fluidi corporei che in cellule esfoliate di HNSCC. Ovchinnikov *et al.* (2012), utilizzando la PCR specifica per metilazioni (MSP) hanno identificato un pannello di tre geni, *RASSF1A*, *DAPK1* e *CDKN2A*, che era in grado di rilevare la presenza di tumore dal DNA presente nella saliva di pazienti con HNSCC con un'accuratezza dell'81%, quando comparato al DNA estratto dalla saliva di controlli sani e non fumatori, comprovando l'applicazione di questo liquido biologico per la valutazione dello stato di ipermetilazione dei geni oncosoppressori.

Righini *et al.* (2003) hanno esaminato 90 pazienti con HNSCC ed hanno ottenuto una buona concordanza tra lo status di metilazione di *TIMP3*, *ECAD*, *p16*, *MGMT*, *DAPK* e *RASSF1* in campioni appaiati di tessuto tumorale e saliva. Morandi *et al.* (2015) hanno rilevato una elevata sensibilità delle aberrazioni di metilazione dei geni *GP1BB* e *ZAP70* a partire da campioni di citobrushing orali, utilizzate come marker per discriminare tra carcinoma squamocellulare orale e controlli sani o con *lichen planus* orale; *MiR137* è inoltre risultato ipermetilato nel 100% di casi di *lichen planus*. L'ipermetilazione di *KIF1A* era invece significativamente associata alle mutazioni di *TP53*.

Anche l'isolamento degli esosomi dalla saliva è stato testato ed ottimizzato, anche se i meccanismi biologici e il ruolo funzionale delle vescicole nella saliva di HNSCC rimangono tutt'ora da chiarire (Principe *et al.*, 2013). Si suppone che la presenza di patologie possa influenzare le caratteristiche degli esosomi, ad esempio le vescicole salivari presenti in corso di HNSCC presentano variazioni nella dimensione, nella densità e nell'espressione del CD63 rispetto a quelle non neoplastiche (Principe *et al.*, 2013).

Nonostante i numerosi tentativi di utilizzare la saliva con le tecnologie ad alte prestazioni, non è stata dimostrata la presenza di una singola molecola o di una combinazione di queste che avesse un'elevata accuratezza e specificità nell'effettuare una diagnosi precoce, previsioni prognostiche, o per monitorare la risposta al trattamento. Ulteriori studi di integrazione e di validazione saranno determinanti per valutare l'applicazione clinica dei potenziali biomarkers salivari descritti per gli HNSCC. È necessario anche tenere presente che la radioterapia è comunemente utilizzata per il trattamento degli HNSCC, di cui la xerostomia è uno dei principali effetti collaterali, il che sottolinea l'importanza di combinare diversi fluidi corporei per il monitoraggio di questa neoplasia.

### **5.7 L'analisi delle metilazioni in oncologia veterinaria**

L'analisi dei pattern di metilazione ha recentemente trovato interesse anche in medicina veterinaria, sia per indagini evoluzionistiche tra specie diverse (Bianiaki *et al.*, 2017) che per indagini patogenetiche per patologie di diversa origine. L'ambito oncologico rimane tuttavia quello maggiormente indagato, soprattutto per quelle neoplasie che da tempo sono state identificate come modelli spontanei di patologia umana. La neoplasia maggiormente indagata con un approccio multidisciplinare è sicuramente il linfoma del cane, ed in particolare il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), che, oltre ad essere l'istotipo più comune in diverse

specie, condivide con il linfoma non-Hodgkin dell'uomo numerose caratteristiche fenotipiche e genotipiche (Marconato *et al.*, 2013; Mudaliar *et al.*, 2013; Aresu, 2016).

Numerosi studi in medicina umana hanno mostrato che perturbazioni dei pattern epigenetici sono eventi frequenti nei linfomi a cellule B (Pan *et al.*, 2015), ma le modificazioni epigenetiche alla base del linfoma a cellule B del cane sono state poco investigate, e gli studi sui pattern anomali di metilazione si focalizzavano principalmente su singoli geni, tra cui *DLC1*, *ABCB1*, *TFPI2*, *FHIT* e *p16* (Bryan *et al.*, 2009; Hiraoka *et al.*, 2009; Tomiyasu *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2014; Ferraresso *et al.*, 2014; Fujiwara-Igarashi *et al.*, 2014). Successivamente, sono state condotte analisi genomiche complete sui pattern di metilazione: il primo (Ferraresso *et al.*, 2017) ha indagato 29.513 sequenze (di cui 29.298 CpG e 215 sequenze codificanti), di cui sono state identificate 1.011 CpG ipermetilate e 183 ipometilate in campioni di linfonodi affetti da DLBCL rispetto a linfonodi controllo; queste sequenze sono associate a 823 geni. Le sequenze ipermetilate erano soprattutto a livello di regioni a monte o dei promoter, mentre quelle ipometilate erano maggiormente a livello intragenico e nelle regioni a valle, confermando che le regioni CpG sono altamente suscettibili alle metilazioni durante l'oncogenesi, determinando così il silenziamento genico. Al contrario, le regioni povere di CpG vanno incontro ad una riduzione globale delle metilazioni genomiche affliggendone la stabilità, la trascrizione e lo splicing.

L'integrazione di questi dati con quelli precedenti di Mudaliar *et al.* (2013), ha rilevato una concordanza su un totale di 107 geni che risultavano downregolati per l'ipermetilazione delle regioni promoter o a monte, così come per le regioni CpG ipermetilate a livello intragenico. Non sono state rilevate concordanze, invece, per le regioni a valle e le CpG ipometilate. Le regioni con

alterazioni della metilazione comprendevano geni codificanti per proteine che hanno ruoli chiave nello sviluppo e nella determinazione del destino cellulare, quali *HOX*, *BMP*, *WNT* e *SOX*.

Il secondo studio (Yamazaki *et al.*, 2017) ha invece fatto il medesimo confronto tra linee cellulari di linfoma di cane e cellule leucocitarie circolanti di animali sani, evidenziando che le linee cellulari derivate da linfoma hanno dei siti CpG ipermetilati a livello di CGI, che erano non metilati nelle cellule mononucleate del sangue periferico dei cani sani; possiedono inoltre siti ipometilati nei tratti non-CGI che sono invece metilati nelle cellule normali.

Più recentemente, un altro studio ha confrontato la presenza di alterazioni globali di metilazione del genoma a livello di sangue periferico in cani con DLBCL per valutarne il ruolo come biomarker (Epiphany *et al.*, 2019). In questo studio è stato evidenziato come i leucociti dei cani affetti da linfoma mostrino un'ipometilazione del DNA globale se comparati con i leucociti di cani sani, suggerendo che i cani con linfoma presentano una diminuzione generalizzata della metilazione del DNA. Questi risultati sono stati validati alla luce del fatto che nei cani con linfoma i linfociti circolanti siano presenti in quantità maggiore rispetto ai sani, e che non vi fossero correlazioni tra la quantità di metilazione globale e il numero di linfociti circolanti.

Anche il linfoma del gatto è stato indagato in uno studio del 2017 (Fujita e Kaneda, 2017) in cui è stato testato in vitro l'effetto di un inibitore delle metilazioni, il *5-aza-2'-deossicitidina* (*5-aza*) in grado di legarsi alle DNMT inibendone la dissociazione dal DNA e causando quindi una demetilazione passiva del DNA; questo inibitore è attualmente approvato dalla *Food and Drug Administration* negli Stati Uniti D'America per l'utilizzo clinico in corso di leucemia mielodisplastica acuta dell'uomo. L'utilizzo di questo inibitore su tre linee cellulari di linfoma felino ha mostrato una inibizione della proliferazione cellulare in tutti i casi. Per confermare che il cambiamento di espressione cellulare provenisse da aberrazioni delle metilazioni del DNA, è stata analizzata

l'espressione di sei geni mediante real-time PCR tra cui *Bcl2* e *Bcl-xL* (geni anti-apoptotici), *CDKN1B* (inibitore del ciclo cellulare ciclina-dipendente), *EZH2* (gene per la *istone-metiltransferasi* riportato come correlato al linfoma dell'uomo), il gene *SOX11* (gene codificante per un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo embrionale e nell'ongenesi) ed infine il gene *OSM* (conosciuto come Oncostatina M, gene per una citochina appartenente al gruppo delle interleuchine-6). L'analisi della metilazione si è concentrata sul gene *SOX11* poiché la sua espressione risultava de-repressa nelle cellule trattate con *5-aza*; è stata infatti rilevata una ipermetilazione nelle regioni a monte del gene nelle cellule non trattate, mentre nelle cellule trattate erano significativamente ipometilate.

Lo stesso trattamento è stato utilizzato su linee cellulari di melanoma sia di uomo che di cane, in cui è stata in passato identificata la *downregulation* del microRNA *miR-203*, un miRNA antioncogenico. L'utilizzo del *5-aza*, infatti, sopraregolava l'espressione del miRNA, facendo supporre che la *downregulation* del gene fosse dovuta a metilazioni delle regioni a monte. Tali metilazioni sono state inoltre identificate mediante PCR metilazione-specifica e sequenziamento con bisolfito a livello di regione codificante (*MIR203*) sia nelle cellule umane che canine (Noguchi *et al.*, 2015).

Ulteriori neoplasie indagate a livello epigenetico sono state il carcinoma mammario del cane ed il mastocitoma. Nel carcinoma mammario, anch'esso comprovato modello naturale per l'uomo, è stato valutato lo stato di metilazione a livello di geni per il recettore estrogenico (*ESR $\alpha$* ) non riscontrando, a differenza di quanto riportato per l'uomo, nessuna differenza di pattern di metilazione a carico della regione promoter *ESR1* tra tumori maligni, benigni e mammella normale, indicando che la diversa espressione del gene non è quindi influenzata da modificazioni epigenetiche (Brandão *et al.*, 2018). È stato inoltre valutato il gene *BRCA1* (associato al cancro al

seno familiare nell'uomo e alterato, in maniera analoga, nel cane in corso di carcinoma mammario), riscontrato invece metilato a livello di regione 5' fiancheggiante il gene (Qiu e Lin, 2016).

Per quanto riguarda il mastocitoma, il tumore maligno cutaneo più frequentemente del cane (fino al 21% delle neoplasie cutanee; Kiupel, 2016), è stato valutato lo status globale di metilazione mediante marcatura immunostochimica con anticorpo verso 5-metilcitosina in relazione al grado di differenziazione, rivelando che l'espressione della 5-metilcitosina era meno intensa nei mastocitomi di grado III, e che quindi i fenomeni di metilazione risultano globalmente inferiori nei mastocitomi scarsamente differenziati (Morimoto *et al.*, 2017). Un secondo studio, più recente (Vozdova *et al.*, 2019), ha invece indagato in maniera preliminare lo status di metilazione del gene *KIT* (che nel mastocitoma cutaneo è già notoriamente coinvolto con mutazioni a carico degli esoni 8, 9 e 11) e *TP53*; sia per il gene *KIT* che *TP53* sono state individuate varie sequenze CpG nelle regioni regolatrici del gene coinvolte in maniera variabile dai fenomeni di metilazione, anche se in quantità tale da richiedere ulteriori analisi su un numero maggiore di casi per poter confermare la validità biologica di questi eventi nella patogenesi del mastocitoma.

## Capitolo VI - Contributo sperimentale

### **Analisi delle metilazioni del DNA e stato mutazionale di p53 per differenziare il carcinoma squamocellulare orale dalla mucosa non neoplastica nel gatto: studio pilota**

Il carcinoma squamocellulare orale è la neoplasia con comportamento a maggiore malignità sia nell'uomo che nel gatto. Vi sono numerose sovrapposizioni sia ad un livello clinico che biomolecolare tra il carcinoma squamocellulare di testa e collo dell'uomo (HNSCC) e quello orale felino (FO SCC), motivo per cui è stato proposto il tumore felino come modello spontaneo di studio per la patologia umana (Tannehill-Gregg *et al.*, 2006; Wypij, 2013; Supsavhad *et al.*, 2016).

Così come nelle persone, il FO SCC è associato ad elevata invasività e lisi ossea, e a causa della sua localizzazione e aggressività, la diagnosi è molto spesso tardiva, influenzando la scelta terapeutica e la sua efficacia (Jimi *et al.*, 2013 Withrow *et al.*, 2013). La prognosi è infausta nella maggior parte dei casi, ed anche con un approccio terapeutico multimodale, il tempo di sopravvivenza raramente supera i 12 mesi (Withrow *et al.*, 2013, Marconato *et al.*, 2013, Piegols *et al.*, 2018). Uno studio recente ha messo in evidenza ulteriori analogie con la patogenesi di questo tumore nell'uomo identificando una prevalenza più alta di mutazioni del gene TP53 nei FO SCC rispetto alle mucose orali o con lesioni infiammatorie, suggerendo inoltre un'utilità prognostica della p53 nella diagnosi precoce del cancro orale del gatto (Renzi *et al.*, 2019).

Nell'ultimo ventennio, le modificazioni epigenetiche hanno ricevuto attenzione via via maggiore come promotori dell'iniziazione e della progressione tumorale nell'uomo, oltre, e persino più frequentemente, alle inattivazioni strutturali dei geni in seguito a mutazioni e delezioni (Feinberg 2006; Choi and Lee 2013; Nebbioso, 2018). La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico in grado di regolare la funzionalità proteica, l'espressione genica ed il metabolismo dell'RNA senza alterare le sequenze di DNA (Portela and Esteller, 2010; Baylin and Jones 2011; Stein, 2011; Spruijt 2014; Takeshima, 2019). Le metilazioni aberranti del DNA che coinvolgono le sequenze promoter delle isole citosina-fosfato-guanina (CpG) sono state correlate al silenziamento dei geni di soppressione tumorale o ad attività oncogenica nei tumori dell'uomo più comuni (Jones, and Baylin 2002; Qureshi *et al.*, 2010; Ehrlich, 2009; Vrba e Futscher, 2018; Michalak, 2019). Numerosi studi hanno identificato un pannello di geni variabilmente metilati nel carcinoma squamocellulare orale dell'uomo a partire da saliva o da campioni di brushing mucosale, avvalorando l'importanza delle metilazioni epigenetiche come marker diagnostici rivelabili con tecniche non invasive (Demokan *et al.*, 2010; Langevin *et al.*, 2010; Pattani 2010; Schussel *et al.*, 2013). Ulteriori studi hanno dimostrato le medesime metilazioni sono presenti anche nel tessuto istologicamente normale adiacente al tumore e nelle lesioni preneoplastiche, suggerendo che tali eventi epigenetici siano piuttosto precoci nel pathway carcinogenico orale (Kulkarni and Saranath 2004; Kato *et al.*, 2006; Mishra, 2012, Morandi, 2015).

Pochi studi hanno indagato i pattern di metilazione del DNA in oncologia veterinaria (Morimoto *et al.*, 2017; Brandão *et al.*, 2018; Yamazaki *et al.*, 2018; Epiphanyo *et al.*, 2019) e non sono attualmente disponibili informazioni sullo stato di metilazione nei FOSCC.

L'obiettivo di questo studio esplorativo è stato quello di analizzare lo stato di metilazione di 10 geni potenziali insieme all'analisi mutazionale del gene TP53 in campioni istologici di FOSCC. I risultati sono stati poi comparati con campioni di mucosa non neoplastica (normale ed infiammatoria) con il fine di identificare un pannello di geni aberranti che consenta di discriminare la mucosa neoplastica da quella non neoplastica.

Per 10 di questi casi, la stessa analisi è stata inoltre condotta parallelamente su campioni citologici ottenuti mediante brushing della mucosa orale, per poter validare l'utilità di questa metodica come test di screening precoce e minimamente invasivo.

## **6.1 Materiali e metodi**

### *Dichiarazione etica*

Poiché la ricerca non ha influenzato nessuna decisione terapeutica, non è stata necessaria l'approvazione di un comitato etico.

Tutti i campioni esaminati sono stati raccolti per fini diagnostici come parte delle normali procedure routinarie. I proprietari hanno fornito il loro consenso informato al campionamento citologico e consapevolmente accettato che i dati clinici ed il materiale biologico stoccato venissero utilizzati a fini di ricerca.

### *Criteri d'inclusione ed informazioni sui pazienti*

È stato realizzato un controllo retrospettivo-prospettico dell'archivio dei casi pervenuti presso l'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (Università di Bologna) dal 2011 ad oggi, che includesse tutti i casi con diagnosi istologica di FOSCC ed infiammazioni croniche orali. A questi sono stati aggiunti 10 campioni prelevati post-mortem di mucosa orale felina con aspetto istologico normale da gatti di almeno 7 anni,

deceduti per cause non legate a patologie orali. Il campionamento è stato eseguito in tutti gli animali dalla gengiva premolare mascellare.

I dati clinici dei pazienti sono stati revisionati per raccogliere le informazioni demografiche e la localizzazione del tumore.

Per ogni caso incluso, sono state ritagliate sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE), colorate con ematossilina-eosina e revisionate per riconfermare la diagnosi. Ulteriori sezioni istologiche in sequenza sono state tagliate per l'analisi genetica.

Oltre a questi, per 5 casi di FOSCC e 5 casi di stomatiti, sono stati raccolti campioni citologici della mucosa orale mediante brushing (cytobrush) posti in DNA/RNA shield (Zymo Research, Europe, Freiberg, Germany) da sottoporre ad analisi genetica.

L'analisi genetica è stata effettuata presso la sezione di Anatomia Patologica dell'ospedale "M. Malpighi" di Bologna, e presso l'unità di Neurologia, IRCCS Istituto di Neuroscienze di Bologna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna presso l'Ospedale "Bellaria".

#### *Analisi delle metilazioni del DNA*

Il DNA di sezioni spesse 10 µm provenienti da campioni FFPE (5 sezioni per campione) e dei campioni citologici prelevati mediante brushing orale è stato estratto mediante kit MastePure Complete DNA extraction (Epicentre, code MC85200, Madison, WI, USA). Il trattamento del DNA genomico mediante bisolfito (200-500 ng) è stato eseguito con EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe, Freiberg, Germany) secondo le istruzioni del produttore. Il pannello di geni target era caratterizzato da 10 geni: 9 di questi sono stati selezionati poiché i loro ortologhi umani possiedono un pattern aberrante di metilazione già confermato in studi sul carcinoma squamocellulare orale dell'uomo (Marsit *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012; Guerrero-

Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2017); oltre a questi è stato aggiunto il gene ortologo *MAGEC2*, appartenente alla famiglia MAGE-type, che è stato riscontrato essere disregolato nei carcinomi di testa e collo dell'uomo (Zamunè *et al.*, 2015; Lian *et al.*, 2018).

La lista delle regioni genomiche e delle coordinate investigate in questo studio sono disponibili nella Tabella 3.1; per identificare le possibili isole CpG sulle regioni promoter dei geni, sono state utilizzate come sequenze query le sequenze raccolte nel browser genomico Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). MethPrimer designing è stato utilizzato per identificare le CpG e la miglior scelta dei primer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Sono state generate librerie di ampliconi bisulfite locus-specifiche con primers identificati utilizzando la DNA polimerasi *Phusion U* (ThermoFisher, cod. F555L, Waltham, MA, USA), che consente l'amplificazione di elevata accuratezza del DNA trattato con bisulfite. La libreria è stata preparata in due step: una prima amplificazione mediante PCR multiplex per l'arricchimento del target, ed una seconda amplificazione con un numero più basso di cicli per consentire il barcoding degli ampliconi template-specifici ottenuti dal primo step di amplificazione. Il barcoding è stato effettuato utilizzando il kit Nextera™. Dopo ogni step di PCR il prodotto dell'amplificazione è stato purificato utilizzando MagSi-NGSPREP (MagnaMedics, code MDKT00010075, Geleen, Netherlands) e quantificato con il fluorometro Quantus (Promega, code E6150, Milan, Italy). Per l'inclusione era necessaria una lunghezza minima di lettura di 50 paia di base (bp). Il sequenziamento è stato condotto su sequenziatore MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore.

I file FASTQ già tagliati per l'identificatore multiplex sono stati processati per il controllo qualità (>Q30), per la lunghezza di lettura (> 80 bp) ed uniti in un ambiente galaxyproject. Per

la valutazione del rapporto di metilazione di ciascuna isola CpG (methylation ratio) è stato usato Perl per creare specifici dati singoli per ogni regione di interesse indagata. Per ogni caso è stata calcolata, mediante Kismeth (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/>), la proporzione degli ampliconi metilati in ogni isola CpG analizzata ( $\beta$ -value) dei geni selezionati.

#### *Analisi mutazionale di TP53*

L'analisi mutazionale di *TP53* sugli esoni 5-8 è stata effettuata secondo i dati già presenti in letteratura (Renzi *et al.*, 2019). I casi sono stati classificati come mutati quando presentavano una o più alterazioni nella sequenza nucleotidica degli esoni amplificati della *TP53* felina, con esito in cambiamento di un aminoacido e conseguente impatto negativo sulla funzionalità proteica, secondo PolyPhen-2, e che mostravano una frequenza di variabilità dell'allele (VAF) > 10%.

#### *Analisi statistica*

I dati continui sono stati testati per la normalità con il test di D'Agostino e Pearson omnibus. Le variabili sono state sintetizzate come la media  $\pm$  la deviazione standard in caso di distribuzione normale, o come mediana con range in caso di distribuzione non normale.

Per i campioni biotici FFPE è stata utilizzata un'analisi volcano plot per selezionare i siti CpG metilati in maniera differenziale sulla base del fold change (FC) in combinazione con i P values corretti utilizzando il metodo di Simes per il controllo del tasso di false scoperte (False discovery rate, Q-values). I P values non corretti sono stati calcolati effettuando i test di permutazione t-test o con test della somma dei ranghi di Wilcoxon, in base al numero di soggetti comparati. Il confronto è stato effettuato tra FOSCC e mucosa non neoplastica e tra stomatiti e mucosa normale. Il  $\Delta\beta$  tra I brushing e I campioni biotici è stato calcolato in base

ad un CpG-wise, la differenza numerica tra le medie dei valori  $\beta$ . I risultati sono stati posti graficamente in un volcano plot. La relazione tra le mutazioni di TP53 e la diagnosi è stata valutata con test esatto di Fisher.

La regressione logistica regolarizzata Lasso ( $\ell_1$ ) è stata applicata per i dati di metilazione nel carcinoma squamocellulare orale (OSCC) rispetto alla mucosa non neoplastica, per selezionare un sottogruppo significativo di potenziali siti CpG identificati mediante l'analisi volcano plot. Anche le disregolazioni di TP53 sono state incluse nel modello. La regressione di Lasso restringe le stime del coefficiente a zero, con il grado di restringimento dipendente dal parametro di sintonia  $\lambda$ , eliminando così un numero di variabili. La convalida incrociata three-fold è stata utilizzata per determinare il valore ottimale di  $\lambda$  corrispondente alla minima deviazione. A causa del limitato numero di campioni, le predizioni del modello della regressione logistica lasso selezionati mediante la convalida incrociata erano basate sull'intero set di dati.

Il pattern di metilazione dei 10 campioni cytobrush è stata inoltre comparata con i corrispettivi campioni FFPE utilizzando il test dei ranghi con segno di Wilcoxon, seguito dal metodo di Simes per il controllo del tasso di false scoperte. Il  $\Delta\beta$  tra brushing e campioni biotici è stato calcolato come sopra descritto.

Le analisi sono state effettuate utilizzando un software commerciale (Stata software, v 15, StataCorp LLC, College Station, TX) ed il comando 'lassologit' per eseguire l'analisi di regressione lasso. Il valore di significatività è stato ( $P$ ) è stato posto a 0.05.

## 6.2 Risultati

### *FOSCC*

Nell'analisi sono stati inclusi 31 FOSCC. I tumori provenivano da 27 gatti Europei e dalle razze Siamese, Persiano, Thai e Chartreux. Quattordici animali erano maschi castrati (45,2%) mentre 17 erano femmine sterilizzate (54,8%), con un'età media pari a  $13,4 \pm 2,7$  anni.

Le lesioni erano localizzate sulla gengiva mandibolare (n = 13; 42%), gengiva mascellare (n = 7; 22,6%), lingua (n = 8; 25,8%), mucosa vestibolare (n = 1; 3,2%) e palato duro (n = 2; 6,4%). Ventisette tumori erano di istotipo convenzionale (87%; ben differenziati, n = 8; mediamente differenziati, n = 15; scarsamente differenziati, n = 4). I rimanenti istotipi includevano quello acantolitico (n = 2; 6,5%) e a cellule fuse (n = 2; 6,5%). (Figura 3.4).

Le mutazioni sul dominio di binding di TP53 sono state rilevate in 21 tumori (67,7%). Erano presenti 18 mutazioni missenso, 2 mutazioni nonsense, e 2 delezioni in frame; tutti gli esoni esaminate erano coinvolti (esone 5, n = 7; esone 6, n = 5; esone 7, n = 8; esone 8, n = 2).

### *Infiammazioni croniche orali*

Sono stati inclusi nell'analisi venticinque campioni di lesioni infiammatorie croniche. Le lesioni provenivano da 24 gatti europei ed un Maine Coon, di cui 14 maschi (56%; 13 castrati) e 11 femmine sterilizzate (44%). L'età media era  $8,4 \pm 4,7$  anni. Diciassette gatti (68%) hanno ricevuto diagnosi di stomatite cronica linfoplasmacitaria, di cui 13 (76%) con localizzazione gengivale e 4 (24%) con localizzazione extra-gengivale (mucosa vestibolare). Agli 8 gatti rimanenti è stata diagnosticata una lesione del complesso del granuloma eosinofilo, e tutte queste erano localizzate sulla lingua (Figura 3.4).

Tra questi, in un solo caso (4%) è stata rilevata una mutazione missenso a livello dell'esone 7 del gene *TP53*.

#### *Mucose orali normali*

Sono stati inclusi nell'analisi 12 campioni di mucosa orale normale. Questi provenivano da 10 gatti europei, un Chartreux ed un Persiano, di cui 7 maschi castrati (58,3%) e 5 femmine sterilizzate (41,5%). L'età media era  $10,0 \pm 2,6$  anni (range, 7-15). Le cause del decesso in questi animali includevano malattia renale cronica (n = 3), linfoma intestinale (n = 2), cardiomiopatia (n = 2), cistite emorragica (n = 1), trauma (n = 1), peritonite infettiva felina (n = 1), carcinoma polmonare (n = 1) ed insufficienza epatica (n = 1).

In questi casi, nessuna mutazione del dominio DNA-binding del gene *TP53* è stata rilevata.

#### *Analisi statistica*

Nei campioni biotici lo stato di metilazione di 4 geni era significativamente diverso tra i FOSCC e mucosa non neoplastica (sia lesioni infiammatorie che mucose orali normali), tra cui *FLI1*, *MIR124*, *ZAP70* e *PARP15*. Tra i geni diversamente metilati, *FLI1*, *MIR124* e *ZAP70* erano ipermetilati nei FOSCC, mentre *PARP15* risultava ipometilato.

I volcano plot hanno indicato 27 siti CpG come aventi sia elevato fold-change che significatività statistica (Figura 3.4; Tabella 3.2).

Non erano invece presenti differenze significative nello stato di metilazione tra i FOSCC linguali ed extra-linguali, né tantomeno tra stomatiti linfoplasmacitarie e granulomi eosinofili.

Tra le mucose non neoplastiche, tre geni risultavano diversamente metilati nelle stomatiti orali quando comparati alla mucosa orale normale, tra cui *LRRTM* (ipermetilato), *ZAP70* e *PARP15* (ipometilato).

Le mutazioni di *TP53* erano significativamente più frequenti nei FOSCC che nelle mucose orali non neoplastiche ( $P < 0.0001$ ), senza differenze significative tra FOSCC linguale ed extralinguale, né tra stomatiti linfoplasmacellulari e mucose non neoplastiche.

Sulla base dei dati forniti, è stato proposto un algoritmo step-wise che includeva *TP53*, *FLI1-4*, *FLI1-5*, *MIR124-1* e *PARP-10*. Secondo questo algoritmo, i casi venivano considerati positivi (neoplastici) in presenza di una delle seguenti condizioni: mutazioni di *TP53*; ipermetilazione di *FLI-4* o *FLI-5* ( $\beta > 0.3$ ). I casi *TP53* negativi con valori  $\beta$  *FLI-4* o *FLI-5* compresi tra 0.1 e 0.3 erano considerati positivi solo in presenza di ipermetilazione di *MIR124-1* ed ipometilazione di *PARP15-10*. I casi rimanenti venivano considerati negativi (non neoplastici). L'algoritmo proposto ha consentito la differenziazione dei FOSCC dalle mucose non neoplastiche con una sensibilità del 91,7% ed una specificità del 97% (accuratezza complessiva, 94,7%; Tabelle 3.3 e 3.4).

#### *Analisi dei cytobrush*

L'analisi genetica è stata effettuata su 5 brushing da FOSCC e 5 da stomatite. In tutti i casi era presente concordanza perfetta nello stato mutazionale di *TP53* (1 mutato e 9 wild type) tra la biopsia ed il corrispondente campione cytobrush. Riguardo il confronto della metilazione del DNA, 8 CpG hanno mostrato sia buon *magnitude fold-change* che elevato significato statistico (incluso *MIR124-2*, *KIF1A-2-4*, *KIF1A-6*, *KIF1A-7*, *TERT-1* and *TERT-6*), ma nessuna di queste è stata inclusa nell'algoritmo.

Applicando l'algoritmo proposto sui campioni cytobrush, 2 casi di FOSCC non sono stati correttamente identificati come positivi, mentre tutti i casi non neoplastici sono stati identificati come negativi (sensibilità 60%; specificità 100%; accuratezza 80%).

### 6.3 Discussione

In questo studio sono stati valutati 10 geni ortologi già conosciuti come alterati epigeneticamente nei tumori di testa e collo dell'uomo (Marsit *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012; Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2015; Zamunè *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2017; Lian *et al.*, 2018) in campioni istologici di mucosa orale felina neoplastica e non neoplastica. L'analisi quantitativa delle metilazioni del DNA di una selezione di geni, insieme allo status mutazionale di TP53, ha consentito di discriminare i FOSCC dalle mucose orali non neoplastiche con una sensibilità del 91,7% ed una specificità del 97%.

Due terzi dei campioni di mucosa orale non neoplastica erano caratterizzati da stomatiti croniche, tra cui stomatite ulcerativa, iperplastica e granuloma eosinofilo orale, che spesso possono mimare clinicamente e macroscopicamente il FOSCC. L'utilità di questo confronto è sostenuta dal fatto che diversi geni hanno mostrato bassi livelli di ipo- o ipermetilazione nelle stomatiti, essendo quindi più simili al carcinoma che non alla mucosa normale. Questo non sorprende, poiché sempre più prove hanno dimostrato la relazione tra l'epigenetica e l'infiammazione. Numerosi studi hanno mostrato che l'infiammazione cronica indotta da diversi fattori può indurre metilazione del DNA aberranti (Issa *et al.*, 2001; Maekita *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2008; Niwa *et al.*, 2010); inoltre, l'espressione delle citochine proinfiammatorie ed altri geni legati all'infiammazione possono essere modulati dai meccanismi epigenetici (Zhang *et al.*, 2010; Ishida *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; de Faria *et al.*, 2013; Asa'ad *et al.*, 2017). Da ciò risulta che il pattern epigenetico delle cellule epiteliali

nei siti di infiammazione cronica possono essere simili a quelli presenti nell'SCC orale, suggerendo che l'infiammazione è in grado di avviare specifiche modificazioni epigenetiche nelle cellule epiteliali (Maiuri *et al.*, 2016). In modo particolare per la cavità orale è stata osservata una sovrapposizione tra il pattern di metilazioni del DNA delle periodontiti croniche e quello dei SCC orali dell'uomo (Planello *et al.*, 2016). Per questa ed altre ragioni, è stato supposto che le periodontiti croniche siano un fattore di rischio allo sviluppo dell'SCC orale nell'uomo (Tezal *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2019) e numerose patologie potenzialmente maligne e a carattere flogistico sono ben descritte in medicina umana (Müller, 2017; Dikova 2019).

Considerando la frequenza delle stomatiti croniche nei gatti geriatrici, potrebbe risultare difficile quanto sia affidabile il rischio che queste lesioni vadano incontro a trasformazione neoplastica, nonostante sia stato precedentemente ipotizzato; tuttavia, finora nel gatto non sono state supposte o confermate lesioni orali con significato preneoplastico.

Non tutti i geni esaminati erano ugualmente determinati nella differenziazione tra casi neoplastici e non neoplastici e, all'interno di un singolo gene, non tutte le CpG indagate hanno mostrato diversità statisticamente significative a livello di metilazioni. La posizione della metilazione nel singolo gene può infatti influenzare l'effetto biologico che ne risulta.

Per questo motivo, così come già indicato per l'uomo, ogni CpG dovrebbe essere considerata individualmente e con uno specifico valore soglia (Morandi *et al.*, 2017).

In questo studio, a partire da un pannello di geni selezionati, è stata effettuata una regressione logistica di Lasso con il fine di restringere l'analisi ai geni e alle CpG di maggiore significato informativo, con l'intento di delineare un ipotetico test a costi contenuti senza però inficiare sulla sua accuratezza. In particolare, i geni con la miglior capacità discriminante erano *FLI1* e *MIR124* (ipermetilati) e *PARP15* (ipometilato).

Il gene *FLI1* (*Friend Leukemia Integration 1*) codifica per un fattore di trascrizione della famiglia *E26 transformation specific (ETS)* che regola i geni coinvolti nella proliferazione e differenziazione, e che ha un ruolo conclamato nell'ematopoiesi, nello sviluppo embrionale e nella vasculogenesi (Spyropoulous *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2000.) Le disregolazioni di *FLI1* sono state dimostrate in diversi tipi di tumore dell'uomo, tra cui il Sarcoma di Ewing (Sheffield *et al.*, 2017), carcinoma mammario (Sakurai *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2015) e carcinomi del tratto gastrointestinale (Vymetalkova *et al.*, 2016, Sepulveda *et al.*, 2016). In questo studio, *FLI1* era significativamente ipermetilato nei FOSSC, in maniera sovrapponibile a quanto riscontrato nell'OSCC umano (Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Morandi *et al.*, 2017). Il *FLI1* è stato inoltre dimostrato essere ipermetilato e *downregolato* negli adenocarcinomi gastrico e coloretale, sostenendo il suo ruolo come gene oncosoppressore (Del Portillo *et al.*, 2019). Altri studi sul tumore mammario hanno invece riportato che la sovraespressione di *FLI1* promuova la malignità (Sakurai *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2015), per cui l'esatto ruolo di questo gene nei tumori epiteliali è ancora da chiarificare, e possono essere innescati diversi meccanismi di disregolazione sulla base di fattori multipli.

MiR124 è una molecola di micro-RNA (miRNA) altamente conservata che agisce come soppressore tumorale regolando i geni target e risulta sottoespressa in numerosi tumori dell'uomo, inclusi gli SCC di testa e collo (HNSCC) (Ponomarev *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2018). In questo studio, MiR124-1, una delle varianti precursori del MIR124 maturo, era significativamente ipermetilato nei FOSSC in maniera analoga a quanto riportato nei HNSCC (Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017; Morandi *et al.*, 2017).

La polimerasi Poly-ADP-ribosio (*PARP*) è un enzima nucleare abbondantemente rappresentato, che viene reclutato nella riparazione dei danni al DNA nelle cellule, e assume anche un ruolo nella proliferazione, differenziazione e trasformazione cellulare (Tangutoori *et al.*, 2015). In questo studio, *PARP15* era ipometilato sia nelle stomatiti che nei FOSCC (nonostante non vi fossero differenze significative), mentre l'ortologo umano è stato identificato come un gene oncosoppressore inattivato dall'ipermetilazione del suo promoter in corso di OSCC (Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Morandi 2017) suggerendo che pathway molecolari diversi nelle due specie possono portare ad alterazioni a livello di metilazioni.

Gli altri geni selezionati *TERT*, *KIF1A*, *LRRTM1*, *MAGEC2*, *GP1BB* e *MiR296* non hanno mostrato differenze significative tra le mucose tumorali e quelle non neoplastiche.

In questo studio *LRRTM1* era ipometilato nelle stomatiti rispetto alle mucose normali, non nei FOSCC; il gene *LRRTM1* (*Leucine-rich repeat transmembrane neuronal 1*) codifica per una proteina transmembrana di tipo I che gioca un ruolo importante nello sviluppo neuronale e nella rigenerazione, è stato riscontrato essere promotore della proliferazione cellule nel neuroblastoma e di sopprimere l'apoptosi nel tumore gastrico (Liu *et al.*, 2019). La famiglia delle proteine *Leucine-rich repeats* è anche coinvolta nei processi infiammatori (Dolan *et al.*, 2007).

Il gene *TERT* codifica per una trascrittasi telomerasi-inversa e la sua sopraregolazione porta ad un aumento dell'attività telomerica in molti tumori, facilitando il mantenimento dei telomeri, una capacità di proliferazione illimitata e immortalizzazione (Meyerson *et al.*, 1997). L'ipometilazione di *TERT* è stata descritta negli OSCC e nel glioblastoma umani (Morandi *et al.*, 2017; Nagarajan *et al.*, 2014).

Il gene *ZAP70* codifica per la protein-chinasi associata alla catena  $\zeta$  70kDa, una tirosin-chinasi espressa normalmente nelle cellule natural killer e nei linfociti T. L'ipermetilazione di questo gene è un fattore predittivo negativo per il decorso delle leucemie linfocitiche croniche in termini di progressione e sopravvivenza complessiva (Claus *et al.*, 2014).

Il gene *MAGEC2* appartiene agli antigeni associati al melanoma (*MAGE*), che sono antigeni tumorali frequentemente espressi dei SCC di testa e collo (Zamunè *et al.*, 2015). La metilazione del DNA ha un ruolo critico nella regolazione dell'espressione del gene *MAGE*, mentre il suo ruolo nel tumore orale non è ancora del tutto chiaro (Lian *et al.*, 2018).

*MiR296* è un Micro-RNA coinvolto nella crescita tumorale, nell'angiogenesi e nell'apoptosi; la sua espressione aberrante è stata precedentemente descritta come correlata ai tumori gastrici, vescicali e polmonari (Nordentoft *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017).

*KIF1A* (*kinesin family member 1A*) codifica per una proteina microtubuli-dipendente coinvolta in funzioni cellulari importanti come il trasporto degli organelli e la mitosi; *KIF1A* è stato riscontrato come metilato sia nei HNSCC che in diverse linee cellulari tumorali umane, sostenendo il suo ruolo di gene oncosoppressore.

Il gene *GP1BB* codifica per una proteina eterodimera transmembrana che costituisce il recettore per il fattore di von Willebrandt e che media l'adesione piastrinica nel circolo arterioso. Le mutazioni a carico di *GP1BB* sono associate alla sindrome Bernard Soulier, una coagulopatia ereditaria estremamente rara (Savoia *et al.*, 2011); *GP1BB* è stato riscontrato come ipermetilato anche nel tumore del colon dell'uomo (Cesaroni *et al.*, 2014).

Come nello studio precedente, l'importante ruolo delle disregolazioni dell'oncosoppressore *TP53* nei FOSSC viene corroborata dall'elevata proporzione di tumori mutati (67,7%) (Renzi *et al.*, 2019). *TP53* è stata proposta in questo studio come possibile marker diagnostico

consentendo da solo di discriminare i FOSCC dalle mucose non neoplastiche con un'accuratezza del 83,8%, assumendo così un ruolo cardine nell'algoritmo presentato.

Gli elevati livelli di correlazione tra i campioni bioptici e i brushing sono incoraggianti per quel che riguarda la possibilità di utilizzare l'algoritmo per test di screening. Questo algoritmo necessita, tuttavia, una validazione su una popolazione di campioni indipendente, partendo dalla raccolta dei brushing.

Quando l'algoritmo è stato posto nell'analisi dei 10 campioni citologici da brushing mucosale, la sua sensibilità è calata ad un poco accettabile 60%, mentre la specificità è stata preservata.

In particolare, due casi di FOSCC sono stati classificati erroneamente come negativi; uno di questi è stato, inoltre, classificato negativo anche all'analisi del campione bioptico, facendo ipotizzare che questi risultati possano essere in parte migliorati aumentando il numero di casi.

Altre spiegazioni per la differenza osservata possono includere una grande variabilità nel tipo di cellule che vengono raccolte dal cytobrush rispetto alla biopsia. Dato il numero potenzialmente più elevato di cellule ben preservate mediante campionamento citologico rispetto ai campioni FFPE e alla minore invasività della tecnica, il cytobrush merita comunque ulteriori indagini, anche data la prospettiva di ambire all'utilizzo dell'algoritmo per fini di screening.

In generale, la prova di un algoritmo diagnostico sullo stesso pool di casi da cui l'algoritmo è stato tratto va incontro al ben noto rischio di "model overfitting", che rappresenta uno dei maggiori limiti di questo studio. Applicazioni ripetute ad una nuova serie di campioni sono quindi necessarie per validare l'efficacia dell'algoritmo. Allo stesso modo, per ottenere un'immagine complessiva dei meccanismi epigenetici coinvolti nel FOSCC e quindi creare un confronto con l'uomo più affidabile, risulterebbe preziosa un'analisi globale delle metilazioni

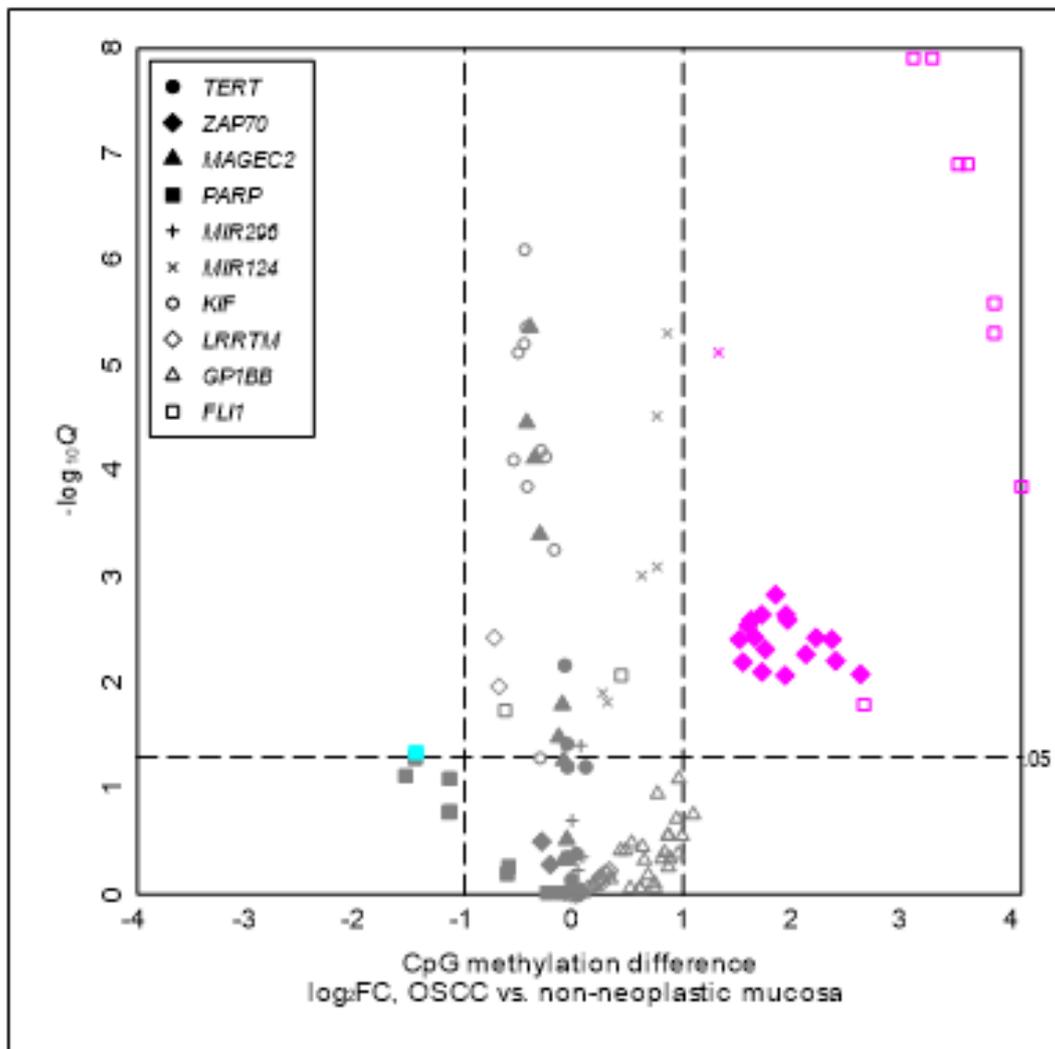
del DNA nei genomi di FOSCC. Nell'uomo è stato riportato che il pattern complessivo delle alterazioni epigenetiche consente di distinguere il tessuto epiteliale di testa e collo normale da quello neoplastico in maniera più efficace che l'analisi dei singoli eventi di metilazione genetica (Marsit *et al.*, 2019). L'impossibilità di effettuare un'analisi così ampia sottende dunque che vengano indagati ulteriori geni con un ruolo comprovato o supposto nella carcinogenesi del FOSCC, insieme ai loro corrispettivi pathway molecolari, come ad esempio EGFR, p16 e la podoplanina.

In conclusione, questi risultati indicano che nei FOSCC sono presenti metilazioni alterate delle regioni promoter di specifici geni del DNA, insieme ad una proporzione elevata di mutazioni di TP53. Queste alterazioni sono rappresentate in maniera più infrequente nella mucosa orale normale e nelle stomatiti croniche del gatto, suggerendone quindi la loro utilità come biomarkers diagnostici. Sono tuttavia necessari ulteriori studi su un maggior numero di casi per confermare l'utilità del test di screening basato sulla rilevazione precoce delle alterazioni genetiche ed epigenetiche nei FOSCC.

**Tabella 3.1**

Lista dei geni indagati in questo studio con i rispettivi primers e coordinate geniche.

Gene	Description	Primer Forward	Primer Reverse	Genome coordinates	Number of interrogated CpG
TERT	Telomerase reverse transcriptase	GGTTTGGGATTTGGGATTA G	AAACCAAACAAAACCCTA CTCTAACT	Chrom A1, strand +: 239596884 - 239596997	6
ZAP70	Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70	GATTTYGAYGGGTTGTTTT G	CTCTCACCTCCAACCTCCA C	Chrom A3, strand -: 62228915 - 62229018	19
KIF1A	Kinesin family member 1A	GGGTAGGGTTGTAGGAGT TTAG	AACTCCAACCTCTTCAAAA CAAAT	Chrom C1, strand -: 221317966 - 221318078	10
LRRTM1	Leucine-rich repeat transmembrane neuronal 1	TATAGTTTGGYGGAGGGAA G	CCACTAACCRATACCACCT TTT	Chrom A3, strand -: 95870863 - 95870975	20
MAGEC2	Melanoma-associate Antigen C2	AGTAGTTTGGGGAAGTTTG TTTTTT	CAATTTAACTACCATCTTA TCTAAACATC	Chrom X, strand +: 113279607 - 113279720	10
GP1BB	Glycoprotein 1b platelet beta subunit	GTTGTTGTTGTTGTTGTTGT TGT	AAACTCCTTAAAACAAAA TCCTATC	Chrom D3, strand -: 27980991 - 27981137	26
PARP15	Poly (ADP-ribose) polymerase family member 15	AATTTTAAGATTATAAGGA AGGTAGAAGTG	CCACAAATTACTATACAA ATTCTTC	Chrom C2, strand +: 68369308 - 68369430	10
FLI1	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor	AGGGTTTAGGGYGTTAGG G	CCACTACCCAATCRCTTAC C	Chrom D1, strand +: 25842815 - 25842926	10
MIR296	MicroRNA 296	TGATTTTTGGTTATTTTAGT TTTG	CACTCTAAAAATTTACTACT AAACACC	Chrom A2, strand -: 163318530 - 163318659	8
MIR124	MicroRNA 124	GGATTAAGATTAGATTTTG TTTTT	AAATTTATTCTACTACCCC TCAAACC	Chrom F2, strand +: 15329020 - 15329156	7



**Figura 3.4.** Volcano plot che mostra i dati di metilazione nel carcinoma squamocellulare orale felino (FOSCC) rispetto alla mucosa orale non neoplastica. I markers illustrati in azzurro e magenta indicano 27 CpG che mostrano sia un elevato *magnitude-fold change* ( $FC > |2|$  or  $\log_2FC > |1|$ ) che significatività statistica ( $Q < .05$  or  $-\log_{10}Q > 1.30$ ). I valori  $P$  sono stati calcolati utilizzando il t-test e corretti con il metodo di Simes (*valore Q*).

**Tabella 3.2.** Ventisette siti CpG diversamente metilati in FOSCC rispetto alla mucosa non neoplastica.

CpG	Fold change	Q-value
FLI1-2	11.4	<0.000001
FLI1-3	12.1	<0.000001
FLI1-4	8.6	<0.000001
FLI1-5	9.7	<0.000001
FLI1-6	14.3	0.000003
FLI1-7	14.3	0.000005
FLI1-8	17.0	0.000139
FLI1-9	6.3	0.015876
MIR124-1	2.5	0.000008
ZAP70-3	3.1	0.003706
ZAP70-4	3.9	0.002520
ZAP70-5	3.8	0.002250
ZAP70-6	3.3	0.007800
ZAP70-7	4.3	0.005305

CpG	Fold change	Q-value
ZAP70-8	6.2	0.008205
ZAP70-9	2.9	0.006300
ZAP70-10	5.3	0.006138
ZAP70-11	2.9	0.003850
ZAP70-12	3.1	0.002520
ZAP70-13	4.6	0.003706
ZAP70-14	3.6	0.001454
ZAP70-15	3.3	0.002250
ZAP70-16	5.1	0.003850
ZAP70-17	3.4	0.004768
ZAP70-18	3.0	0.002845
ZAP70-19	3.8	0.008400
PARP-10	0.4	0.044673

**Tabella 3.3.** Risultati dell'analisi dei dati di metilazione e mutazione nei FOSCC rispetto alle mucose non neoplastiche. Il coefficiente lasso non-zero in scala originale ( $b$ ) ed in unità standard ( $beta$ ), e il rapporto di probabilità ( $odds\ ratio$ ;  $e^{beta}$ ) determinato della convalida incrociata k-fold ( $k = 3$ ) ( $\lambda = 0.919$ , deviance = 0.450).

Predicted class	OSCC	Non-OSCC	All
Positive	22	1	23
Negative	2	32	34
All	24	33	57

**Tabella 3.4.** Matrice di confusione risultante dalla regressione logistica di lasso applicata ai dati di metilazione e mutazione nei FOSCC rispetto alla mucosa non neoplastica. La sensibilità è di 0.917 (22/24) e la specificità di 0.970 (32/33) con accuratezza del 0.947 (54/57).

Variabile	Lasso $b$	Lasso $beta$	Odds ratio
FLI1-4	1.99	0.54	1.71
FLI1-5	5.52	1.53	4.63
MIR124-1	1.62	0.34	1.41
PARP-10	-16.46	-0.78	0.46
p53	3.56	1.65	5.22

*NOTICE: this is the author's version of a work that still has to be submitted for publication. Changes resulting from the publishing process, such as editing, corrections, structural formatting, and other quality control mechanisms may not be reflected in this document. Changes may be made to this work until it will be submitted for publication. A definitive version will be published in : Renzi Andrea, Morandi Luca, Lenzi Jacopo, Bellei Emma, Rigillo Antonella, Giacomini Alessandra, Tinto Debora, Bettini Giuliano, Sabbattini Silvia (2019) "Analysis of DNA methylation and TP53 mutational status for differentiating feline oral squamous cell carcinoma from non-neoplastic mucosa: a preliminary study".*



# Bibliografia

## Parte I

**Alaibac M, Daga A, Harms G, et al.** Molecular analysis of the gamma delta T-cell receptor repertoire in normal human skin and in Oriental cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol.* 1993; 2:106–112.

**Amara K, Trimeche M, Ziadi S, et al.** PCR-based clonality analysis of B-cell lymphomas in paraffin-embedded tissues: diagnostic value of immunoglobulin kappa and lambda light chain gene rearrangement investigation. *Pathol Res Pract.* 2006; 202:425–431.

**Bao Y, Guo Y, Xiao S, et al.** Molecular characterization of the VH repertoire in *Canis familiaris*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 137:64–75.

**Bauer NB, Zervos D, Moritz A.** Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101). *J Vet Intern Med.* 2007; 21:928-935.

**Beaubier NT, Hart AP, Bartolo C, et al.** Comparison of capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of T and B cell clonality by polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol.* 2000; 9:121–131.

**Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M.** Prognostic evaluation of Ki76 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol.* 2011; 48:41-53.

**Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, et al.** Fusion gene transcripts and Ig/ TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR- based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002; 16:368–375.

**Brady SP, Magro CM, Diaz-Cano SJ, et al.** Analysis of clonality of atypical cutaneous lymphoid infiltrates associated with drug therapy by PCR/DGGE. *Hum Pathol*. 1999; 30:130–136.

**Breen M, Modiano JF.** Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans—man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res*. 2008; 16:145–154.

**Breit TM, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ.** Unique selection determinant in polyclonal V delta 2-J delta 1 junctional regions of human peripheral gamma delta T lymphocytes. *J Immunol*. 1994; 152:2860–2864.

**Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, et al.** Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol*. 2003; 40:32–41.

**Carrasco V, Rodríguez-Bertos A, Rodríguez-Franco F, et al.** Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Vet Pathol*. 2015; 52:668-675.

**Chaubert P, Baur Chaubert AS, Sattler U, et al.** Improved polymerase chain reaction-based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *J Vet Diagn Invest*. 2010; 22:20–29.

**Cooper MD, Alder MN.** The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006; 124:815–822.

**Davis MM, Bjorkman PJ.** T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988; 334:395–402.

**Delfau MH, Hance AJ, Lecossier D, et al.** Restricted diversity of V gamma 9-JP rearrangements in unstimulated human gamma/delta T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1992; 22:2437–2443.

**Ehrhart EJ, Wong S, Richter K, et al.** Polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangement: Benchmarking performance of a lymphoid clonality assay in diverse canine sample types. *J Vet Intern Med*. 2019; 33:1392-1402.

**Flood-Knapik KE, Durham AC, Gregor TP, et al.** Clinical, histopathological and immunological characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2013; 11:272-286.

**Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, et al.** Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol*. 1997; 117:61-72.

**Freeman JD, Warren RL, Webb JR, et al.** Profiling the T-cell receptor beta- chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Res*. 2009; 19: 1817–1824.

**Gameiro P, Sebastiaño M, Spetalen S, et al.** The added value of immunoglobulin Kappa light chain gene (IGK) rearrangement analysis in suspected B-cell lymphomas: three illustrative cases. *J Hematop*. 2012; 5:45–56.

**Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, et al.** GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 127:47–56.

**Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Sato M, et al.** Construction of a multicolor GeneScan analytical system to detect clonal rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor genes in canine lymphoid tumors. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015; 15: 81-87.

**Gress V, Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, et al.** Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of T-cell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats. *Res Vet Sci.* 2016; 107:261-266.

**Groenen PJ, Langerak AW, van Dongen JJ, et al.** Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop.* 2008; 1:97–109.

**Hall PA, Richards MA, Gregory WM, et al.** The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1988; 154:223-235

**Hammer SE, Groiss S, Fuchs-Baumgartinger A, et al.** Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2017; 15:1354-1369.

**Henrich M, Hecht W, Weiss AT, et al.** A new subgroup of immunoglobulin heavy chain variable region genes for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 130:59–69.

**Henrich M, Scheffold S, Hecht W, Reinacher M.** High resolution melting analysis (HRM) for the assessment of clonality in feline B-cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018; 200:59-68.

**Hiroko Y, Tamura K, Isotani M, et al.** Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 115:375–382.

**Hiyoshi S, Ohno K, Uchida K, et al.** Association between lymphocyte antigen receptor gene rearrangements and histopathological evaluation in canine chronic enteropathy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015; 165:138-144.

**Hwang MH, Darzentas N, Bienzle D, et al.** A review of canine B cell clonality assays and primer set optimization using large-scale repertoire data. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019; 209:45-52.

**Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, et al.** Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential—differences between men and mice. *J Immunol.* 2006; 176:1543–1552.

**Kaneko N, Yamamoto Y, Wada Y, et al.** Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *J Vet Med Sci.* 2009; 71:555-9.

**Keller SM, Moore PF.** A novel clonality assay for the assessment of canine T cell proliferations. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012; 145:410–419.

**Keller SM, Moore PF.** Rearrangement patterns of the canine TCRgamma locus in a distinct group of T cell lymphomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012; 145:350–361.

**Keller SM, Vernau W, Moore PF.** Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines. *Vet Pathol.* 2016; 53:711-725.

**Kisseberth WC, Nadella MV, Breen M, et al.** A novel canine lymphoma cell line: a translational and comparative model for lymphoma research. *Leuk Res.* 2007; 31:1709–1720.

**Kokovic I, Jezersek Novakovic B, Novakovic S.** Diagnostic value of immuno-globulin kappa light chain gene rearrangement analysis in B-cell lymphomas. *Int J Oncol.* 2015; 46:953–962.

**Korbie DJ, Mattick JS.** Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc.* 2008; 3:1452-1456.

**Kuo FC, Hall D, Longtine JA.** A novel method for interpretation of T-cell receptor gamma gene rearrangement assay by capillary gel electrophoresis based on normal distribution. *J Mol Diagn.* 2007; 9:12–19.

**Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, et al.** EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012; 26:2159–2171.

**Langerak AW, Groenen PJ, Jm van Krieken JH, et al.** Immunoglobulin/ T-cell receptor clonality diagnostics. *Expert Opin Med Diagn.* 2007; 1:451–461.

**Langerak AW.** Undersized, oversized? It is not one-size-fits-all in lymphoid clonality detection. *Leuk Res.* 2008;32(2):203–204.

**Langner KF, Joetzke AE, Nerschbach V, et al.** Detection of clonal antigen receptor gene rearrangement in dogs with lymphoma by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *BMC Vet Res.* 2014; 1:3-10.

**Lee SC, Berg KD, Racke FK, et al.** Pseudo-spikes are common in histologically benign lymphoid tissues. *J Mol Diagn.* 2000;2:145–152.

**Lefranc MP.** IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:307–310.

**Lenze D, Müller H-H, Hummel M.** Considerations for the use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens for clonality analysis. *J Hematop.* 2012; 5:27–34.

**Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al.** Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 2005; 438:803–819.

**Luo V, Lessin SR, Wilson RB, et al.** Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements using fluorescent-based PCR and automated high-resolution capillary electrophoresis. *Mol Diagn.* 2001; 6:169–179.

**Maglennon GA, Murphy S, Adams V, et al.** Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.* 2008; 6:268-274.

**Magro CM, Crowson AN, Kovatich AJ, et al.** Drug-induced reversible lymphoid dyscrasia: a clonal lymphomatoid dermatitis of memory and activated T cells. *Hum Pathol.* 2003; 34:119–129.

**Marsilio S, Ackermann MR, Lidbury JA, Suchodolski JS, Steiner JM.** Results of histopathology, immunohistochemistry, and molecular clonality testing of small intestinal biopsy specimens from clinically healthy client-owned cats. *J Vet Intern Med.* 2019; 33:551-558.

**Massari S, Bellahcene F, Vaccarelli G, et al.** The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in *Canis lupus familiaris*. *Mol Immunol.* 2009; 46: 2728–2736.

**Mazloom A, Medeiros LJ, McLaughlin PW, et al.** Marginal zone lymphomas: factors that affect the final outcome. *Cancer* 2010; 116:4291–4298.

**Miller T, Grogan T, Dahlberg S, et al.** Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferation antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood.* 1994; 83:1460-1466.

**Mineccia M, Massari S, Linguiti G, et al.** New insight into the genomic structure of dog T cell receptor beta (TRB) locus inferred from expression analysis. *Dev Comp Immunol.* 2012; 37:279–293.

**Mochizuki H, Nakamura K, Sato H, et al.** GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gamma gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012; 145:402–409.

**Mochizuki H, Nakamura K, Sato H, et al.** Multiplex PCR and Genescan analysis to detect immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in feline B-cell neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 143:38–45.

**Moore AS, Frimberger AE, Sullivan N, Moore PF.** Histologic and immunohistochemical review of splenic fibrohistiocytic nodules in dogs. *J Vet Intern Med.* 2012; 26:1164-1168.

**Moore PF, Woo JC, Vernau W, et al.** Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;106: 167–178.

**O'Brien D, Moore PF, Vernau W, et al.** Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2013; 27:949-954.

**Ohmura S, Leipig M, Schöpfer I, et al.** Detection of monoclonality in intestinal lymphoma with polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement analysis to differentiate from enteritis in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2017; 15:194-207.

**Payne K, Wright P, Grant JW, et al.** BIOMED-2 PCR assays for IGK gene rearrangements are essential for B-cell clonality analysis in follicular lymphoma. *Br J Haematol.* 2011; 155:84–92.

**Poggi A, Miniscalco B, Morello E, et al.** Flow cytometric evaluation of Ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2015; 13:475-480.

**Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, et al.** Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 2007; 17:1675–1689.

**Przybylski G, Oettle H, Ludwig WD, et al.** Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1994; 87:301–307.

**Raulet DH, Garman RD, Saito H, et al.** Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature.* 1985; 314:103–107.

**Rothberg P, Langerak A, Verhaaf B, et al.** Clonal antigen receptor gene PCR products outside the expected size range. *J Hematop.* 2012; 5:57–67.

**Sabattini S, Bassi P, Bettini G.** Histopathological findings and proliferative activity of canine sebaceous gland tumors with a predominant reserve cell population. *J Comp Pathol.* 2015; 152:145-152.

**Sabattini S, Bottero E, Turba ME, Vicchi F, Bo S, Bettini G.** Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. *J Small Anim Pract.* 2016; 57:396-401.

**Schöpfer I, Ohmura S, Rütgen B, Tsujimoto H, Weber K, Hirschberger J.** Melting curve analysis in canine lymphoma by calculating maximum fluorescence decrease. *Vet Comp Oncol.* 2017; 15:563-575.

**Splangler WL, Kass PH.** Pathologic and prognostic characteristics of splenomegaly in dogs due to fibrohistiocytic nodules: 98 cases. *Vet Pathol.* 1998; 35:488-498.

**Sprouse JT, Werling R, Hanke D, et al.** T-cell clonality determination using polymerase chain reaction (PCR) amplification of the T-cell receptor gamma-chain gene and capillary electrophoresis of fluorescently labeled PCR products. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113:838–850.

**Stefanello D, Valenti P, Zini E, et al.** Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001-2008). *J Vet Intern Med.* 2011; 25:90-93.

**Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, et al.** Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 1999; 13:196–205.

**Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, et al.** Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood.* 1999; 93:4079–4085.

**Takanosu M, Okada K, Kagawa Y.** PCR-based clonality analysis of antigen receptor gene rearrangements in canine cutaneous plasmacytoma. *Vet J.* 2018; 241:31-37

**Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T.** Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22:760–763.

**Tonegawa S.** Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983; 302:575–581.

**Valli VE, San Myint M, Barthel A, et al.** Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol.* 2011; 48:198–211.

**Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, et al.** Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol.* 2006; 43:241–256.

**Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF.** Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol.* 2006;4 3:241-256.

**van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al.** Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003; 17: 2257–2317.

**van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, et al.** Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED- 2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia.* 2007; 21:201–206.

**van Stee LL, Boston SF, Singh A, Romanelli G, Rubio-Guzman A, Scase TJ.** Outcome and prognostic factors for canine splenic lymphoma treated by splenectomy (1995-2011). *Vet Surg.* 2015; 44:976-982.

**Vascellari M, Giantin M, Capello K, et al.** Expression of Ki 67, BCL-2 and COX -2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet Pathol.* 2013; 50:110-121.

**Vernau W, Moore PF.** An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 69:145–164.

**Vessieres F, Rasotto R, Peters I, Villiers E, Berlato D, Cian F.** Assessment of lymphoid molecular clonality in canine thymoma. *J Comp Pathol.* 2018; 158:66-70.

**Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, et al.** Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science.* 2009; 326:865–867.

**Waugh EM, Gallagher A, Haining H, et al.** Optimisation and validation of a PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) assay to detect clonality in canine lymphoid malignancies. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 182:115-124.

**Weiss AT, Hecht W, Henrich M, et al.** Characterization of C-, J- and V-region- genes of the feline T-cell receptor gamma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 124:63–74.

**Weiss AT, Hecht W, Reinacher M.** Feline T-cell receptor gamma V- and J-region sequences retrieved from the trace archive and from transcriptome analysis of cats. *Vet Med Int.* 2010; 2010:953272.

**Weiss AT, Klopffleisch R, Gruber AD.** T-cell receptor gamma chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol.* 2011; 144:123–134.

**Werner JA, Woo JC, Vernau W, et al.** Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. *Vet Pathol.* 2005; 42:596–607.

**Winkler S, Murua Escobar H, Reimann-Berg N, et al.** Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. *Anticancer Res.* 2005; 25:3995–3998

**Yagihara H, Tamura K, Isotani M, et al.** Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 15:375-82.

## Parte II

**Allison RW, Brunker JD, Breshears MA, et al.** Dendritic cell leukemia in a Golden Retriever. *Vet Clin Pathol*, 2008; 37:190–197.

**Ameri M, Wilkerson MJ, Stockham SL, Almes KM, Patton KM, Jackson T.** Acute megakaryoblastic leukemia in a German Shepherd dog. *Vet Clin Pathol*, 2010. 39:39–45.

**Araújo MR, Campos LC, Damasceno KA, Gamba CO, Ferreira E, Cassali GD.** HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Res Vet Sci*. 2016; 106:121-130.

**Aresu L, Aricò A, Ferraresso S, et al.** Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *Vet J*. 2014; 200:318-324.

**Ayl RD, Couto CG, Hammer AS, Weisbrode S, Ericson JG, Mathes L.** Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol*, 1992; 29:386–390.

**Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M.** Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol*. 2011; 48:41-53.

**Beyer J, Kollner B, Teifke JP, et al.** Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002; 49:270–277.

**Bienzle D, McDonnell JJ, Stanton JB.** Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216:1761–1764.

**Bienzle D, Reggeti F, Clark ME, Chow C.** Immunophenotype and functional properties of feline dendritic cells derived from blood and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2003; 96:19– 30.

**Blaker YN, Brodtkorb M, Maddison J, et al.** Computerized image analysis of the Ki-67 proliferation index in mantle cell lymphoma. *Histopathology*, 2015; 67:62-69.

**Blanchard-Channell M, Moore PF, Stott JL.** Characterization of monoclonal antibodies specific for equine homologues of CD3 and CD5. *Immunology* 1994; 82:548–554.

**Bolon B, Calderwood Mays MB, Hall BJ.** Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol*, 1990; 27:96–102.

**Boudreaux MK, Ebbe S:** Evaluation of ploidy of mature canine megakaryocytes, using Feulgen staining and microspectrophotometry. *Am J Vet Res* 1996; 57:1434–1437.

**Braylan R, Orfao A, Borowitz M, Davis B.** Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*, 2001; 46:23–27.

**Bruno S, Darzynkiewicz Z.** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Proliferation*.1992; 25:31–40.

**Bryant RJ, Banks PM, O'Malley DP.** Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. *Histopathology*. 2006; 48:505-515.

**Burkhard MJ, Bienzle D.** Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013; 43:1331-1347.

**Campos M, Ducatelle R, Rutteman G, et al.** Clinical, pathologic, and immunohistochemical prognostic factors in dogs with thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2014; 28:1805-1813.

**Carey JL, Oldaker TA.** More than just quality control. *Clin Lab Med.* 2007; 27:687–707.

**Carrasco V, Rodríguez-Bertos A, Rodríguez-Franco F, et al.** Distinguishing intestinal lymphoma from Inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Vet Pathol.* 2015;52(4):668-75.

**Chalfon C, Martini V, Comazzi S, Aresu L, Stefanello D, Riondato F, Ferrari R, Marconato L.** Minimal residual disease in lymph nodes after achievement of complete remission predicts time to relapse in dogs with large B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2019; 17:139-146.

**Chattopadhyay PK, Hogerkorp CM, Roederer M.** A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology.* 2008; 125:441–449.

**Clemo FA, Crabtree WN, Walker E, DeNicola DB.** Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol.* 1993; 15:418–426.

**Clemo FA, DeNicola DB, Carlton WW, Morrison WB, Walker E.** Flow cytometric DNA ploidy analysis in canine transitional cell carcinoma of urinary bladders. *Vet Pathol.* 1994; 31:207–215.

**Comazzi S, Gelain ME, Martini V, et al.** Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:100-106.

**Comazzi S, Gelain ME, Spagnolo V, Riondato F, Guglielmino R, Sartorelli P.** Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. *Vet Clin Pathol.* 2006; 35:47–54.

**Comazzi S, Gelain ME.** Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J.* 2011; 188:149-155.

**Comazzi S, Martini V, Riondato F, et al.** Chronic lymphocytic leukemia transformation into high-grade lymphoma: a description of Richter's syndrome in eight dogs. *Vet Comp Oncol.* 2017; 15:366-373.

**Culmsee K, Nolte I.** Flow cytometry and its application in small animal oncology. *Methods Cell Sci;* 2002; 24:49–54.

**Danilenko DM, Moore PF, Rossitto PV.** Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): characterization of the CD11/ CD18 family. *Tissue Antigens.* 1992; 40:13–21.

**Darzynkiewicz Z, Huang X.** Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2005; 5:Unit 5.7.

**Davis LL, Hume KR, Stokol T.** A retrospective review of acute myeloid leukaemia in 35 dogs diagnosed by a combination of morphologic findings, flow cytometric immunophenotyping and cytochemical staining results (2007-2015). *Vet Comp Oncol.* 2018; 16:268-275.

**de Albuquerque A, Kubisch I, Stölzel U, et al.** Prognostic and predictive value of circulating tumor cell analysis in colorectal cancer patients. *J Transl Med.* 2012; 13:10:222.

**de Bruijn CM, Veenman JN, Rutten VP, Teske E, van Nieuwstadt RA, van den Ingh TS.** Clinical, histopathological and immunophenotypical findings in five horses with cutaneous malignant lymphoma. *Res Vet Sci.* 2007; 83:63–72.

**Drummond SP, Allen TD.** From live-cell imaging to scanning electron microscopy (SEM): the use of green fluorescent protein (GFP) as a common label. *Methods Cell Biol* 2008; 88:97–108.

**Duque C, Parent J, Bienzle D,** The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16:714–719.

**Faldyna M, Samankova P, Leva L, et al.** Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 119:56–62.

**Fan TM, Barger AM, Fredrickson RL, Fitzsimmons D, Garrett LD.** Investigating CXCR4 expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 2008; 22:602–608.

**Fan TM, Barger AM, Sprandel IT, Fredrickson RL.** Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* 2008; 22:1181–1188.

**Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, et al.** Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol.* 1997; 117:35-59.

**Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, et al.** Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol.* 1997; 117:61–72.

**Fox MH, Armstrong LW, Withrow SJ, et al.:** Comparison of DNA aneuploidy of primary and metastatic spontaneous canine osteosarcomas. *Cancer Res.*1990; 50:6176–6178

**Frazier KS, Hines ME, Hurvitz AI, Robinson PG, Herron AJ.** Analysis of DNA aneuploidy and c-myc oncoprotein content of canine plasma cell tumors using flow cytometry. *Vet Pathol.* 1993; 30:505–511.

**Fry MM, Vernau W, Kass PH, Vernau KM.** Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin Pathol* 2006; 35:72–77.

**Fry MM, Vernau W, Pesavento PA, Bromel C, Moore PF.** Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol* 2003; 40:556–562.

**Fu DR, Kato D, Endo Y, Kadosawa T.** Apoptosis and Ki-67 as predictive factors for response to radiation therapy in feline nasal lymphomas. *J Vet Med Sci.* 2016; 78:1161-1166.

**Gaudio F, Tamma R, Ingravallo G, et al.** Computer-driven quantitative image analysis in the assessment of tumor cell and T cell features in diffuse large B cell lymphomas. *Ann Hematol.* 2018; 97:663-668.

**Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S.** Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 121:179–188.

**Gibson D, Aubert I, Woods JP, et al.** Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. *J Vet Intern Med.* 2004; 18:710–717.

**Gioacchini FM, Alicandri-Ciuffelli M, Magliulo G, Rubini C, Presutti L, Re M.** The clinical relevance of Ki-67 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015; 272:1569-1576.

**Hall PA:** DNA ploidy analysis in histopathology: DNA ploidy studies in pathology—a critical appraisal. *Histopathology* 2004; 44:614–620.

**Hedley DW.** Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry.* 1989; 10:229–241.

**Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A.** Prognostic factors in canine mammary tumors: a multi-variate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 1993; 30:20–27.

**Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR.** Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 2006; 7:681–685.

**Hida AI, Bando K, Sugita A, et al.** Visual assessment of Ki67 using a 5-grade scale (Eye-5) is easy and practical to classify breast cancer subtypes with high reproducibility. *J Clin Pathol.* 2015; 68:356-361.

**Hida AI, Oshiro Y, Inoue H, Kawaguchi H, Yamashita N, Moriya T.** Visual assessment of Ki67 at a glance is an easy method to exclude many luminal-type breast cancers from counting 1000 cells. *Breast Cancer.* 2015; 22:129-134.

**Hoster E, Rosenwald A, Berger F, et al.** Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: results from randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 2016; 34:1386-1394.

**Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z.** Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38:223–243.

**Hurley AA.** Quality control in phenotypic analysis by flow cytometry. *Curr Protoc Cytometry.* 2010; 6:Unit 6.1.

**Ibrahim SF, van den Engh G.** Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;106:19–39.

**Imam A, Stathopoulos E, Taylor C.** BLA.36: a glycoprotein specifically expressed on the surface of Hodgkin's and B cells. *Anticancer Res* 1990; 10:1095–1104.

**Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VE, et al.** CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet Pathol* 2005; 42:468–476.

**Kang SK, Park NY, Cho HS, et al.** Relationship between DNA ploidy and proliferative cell nuclear antigen index in canine hemangiopericytoma. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18:211–214.

**Kapczynski DR.** Evaluating the cell-mediated immune response of avian species to avian influenza viruses. *Methods Mol Biol.* 2008; 436:113–126.

**Kiupel M, Teske E, Bostock D.** Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol.* 1999; 36:292-300.

**Klimowicz AC, Bose P, Nakoneshny SC, et al.** Basal Ki67 expression measured by digital image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2012; 48:2166-2174.

**Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, et al.** Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology.* 2013; 84:219-225.

**Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C.** Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol.* 2010; 2:351-365.

**Kreipe H.** Ki67: biological intertumor variance versus variance of assay. *Pathologie.* 2018; 39(Suppl 2):272-277.

**Lana S, Plaza S, Hampe K, Burnett R, Avery AC:** Diagnosis of mediastinal masses in dogs by flow cytometry. *J Vet Intern Med* 2006; 20:1161–1165

**Lee BW, Olin MR, Johnson GL, Griffin RJ.** In vitro and in vivo apoptosis detection using membrane permeant fluorescent-labeled inhibitors of caspases. *Methods Mol Biol* 2008; 414:109–135.

**Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN.** Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015; 11:1566-1572.

**Lin YC, Huang YC, Wang YS, Juang RH, Liao KW, Chu RM.** Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 133:144–153.

**Longobardi Givan A.** Flow cytometry. In: *First Principles*, 2nd ed., pp. 125–131. Wiley-Liss, New York, NY, 2001.

**Lurie DM, Milner RJ, Suter SE, Vernau W.** Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 125:102–110.

**Madewell BR, Deitch AD, Higgins RJ, Marks SL, deVere White RW.** DNA flow cytometric study of the hyperplastic and neoplastic canine prostate. *Prostate* 1991; 18:173–179.

**Maeda I, Abe K, Koizumi H, et al.** Comparison between Ki67 labeling index determined using image analysis software with virtual slide system and that determined visually in breast cancer. *Breast Cancer.* 2016; 23:745-51.

**Mahnke YD, Roederer M.** Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* 2001; 27:469–485.

**Marconato L, Bonfanti U, Stefanello D, et al.** Cytosine arabinoside in addition to VCAA-based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Vet Comp Oncol.* 2008; 6:80-9.

**Martini V, Bernardi S, Marelli P, Cozzi M, Comazzi S.** Flow cytometry for feline lymphoma: a retrospective study regarding pre-analytical factors possibly affecting the quality of samples. *J Feline Med Surg.* 2018; 20:494-501.

**McCarthy DA, Macey MG, Allen PD.** A simple, novel, procedure for monitoring membrane scrambling and permeability in micro- particles, platelets, and leukocytes in whole blood samples. *Exp Hematol* 2008; 36:909–921.

**McCoy JP Jr.** Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16:229–243.

**McCoy JP Jr.** Handling, storage, and preparation of human blood cells. *Curr Protoc Cytometry* 2010; 5:Unit 5.1.

**McKenna KC, Beatty KM, Vicetti MR, Bilonick RA.** Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b<sup>+</sup> CD15b<sup>+</sup> granulocytes which inhibit T cell function. *J Immunol Methods* 2009; 341:68–75.

**Meichner K, Fogle JE, English L, Suter SE.** Expression of Apoptosis-regulating Proteins Bcl-2 and Bax in Lymph Node Aspirates from Dogs with Lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2016; 30:819-26.

**Meyer J, Delay J, Bienzle D.** Clinical, laboratory, and histopathologic features of equine lymphoma. *Vet Pathol* 2006; 43:914–924.

**Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA.** hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 1997 Aug 22;90:785-95.

**Minke JM, Cornelisse CJ, Stolwijk JA, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Rutteman GR, Misdorp W.** Flow cytometric DNA ploidy analysis of feline mammary tumors. *Cancer Res* 1990; 50:4003–4007.

**Modiano JF, Breen M, Burnett RC, et al.** Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res* 2005; 65:5654–5661.

**Moore PF, Rossitto PV, Danilenko DM, Wielenga JJ, Raff RF, Severns E.** Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens* 1992; 40: 75–85.

**Mueller RS, West K, Bettenay SV.** Immunohistochemical evaluation of mononuclear infiltrates in canine lupoid onychodystrophy. *Vet Pathol* 2004; 41:37–43.

**Muppidi J, Porter M, Siegel RM.** Measurement of apoptosis and other forms of cell death. *Curr Protoc Immunol* 2010.; 3:Unit 3.17

**Mustafa A, Gillmeister L, Hernandez WP, et al.** Viability and function in lymphocytes cultured from the horse, chicken, and mouse: effects of different leukocyte enrichment techniques. *J Immunoassay Immunochem* 2008; 4:370–389.

**Nguyen D, Diamond LW, Braylan RC.** A visual approach to data analysis and interpretation. In: *Flow Cytometry in Hematopathology*, 2nd ed., pp. 1–48. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.

**Öztürk Sari Ş, Taşkin OÇ, Yegen G, Özlük Y, Güllüoğlu M.** Ki67 Scoring in pancreatic neuroendocrine tumors by a new method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018; 26:283-287.

**Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N.** Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*. 2017; 49:166-171.

**Perfetto SP, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay P, Roederer M.** Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006; 1:1522–1530.

**Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR.** Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*. 2000; 12:111-117.

**Poggi A, Miniscalco B, Morello E, et al.** Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2015; 13:475-480.

**Poggi A, Miniscalco B, Morello E, et al.** Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2017; 15:431-440.

**Reggeti F, Bienzle D.** Flow cytometry in veterinary oncology. *Vet Pathol*. 2011; 48:223-235.

**Roccabianca P, Vernau W, Caniatti M, Moore PF.** Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8 (alpha)(alpha) phenotype. *Vet Pathol* 2006; 46:15–28.

**Roccabianca P, Woo JC, Moore PF.** Characterization of the diffuse mucosal associated lymphoid tissue of feline small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 75:27–42.

**Røge R, Riber-Hansen R, Nielsen S, Vyberg M.** Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 158:11-19.

**Rout ED, Avery PR.** Lymphoid neoplasia correlations between morphology and flow cytometry. *Vet Clin Small Anim* 2017; 53–70.

**Rout ED, Shank AM, Waite AH, Siegel A, Avery AC, Avery PR.** Progression of cutaneous plasmacytoma to plasma cell leukemia in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2017; 46:77-84.

**Rütgen BC, Hammer SE, Gerner W, et al.** Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk Res.* 2010; 34:932–938.

**Rutteman GR, Cornelisse CJ, Dijkshoorn NJ, Poortman J, Misdorp W.** Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res.* 1988; 48:3411–3417.

**Sabattini S, Bassi P, Bettini G.** Histopathological findings and proliferative activity of canine sebaceous gland tumours with a predominant reserve cell population. *J Comp Pathol.* 2015; 152:145-52.

**Sabattini S, Lopparelli RM, Rigillo A, et al.** Canine splenic nodular lymphoid lesions: immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment. *Vet Pathol.* 2018; 55:645-653.

**Sachdeva N, Asthana D.** Cytokine quantitation: technologies and applications. *Front Biosci.* 2007; 12:4682–4695.

**Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9:676-82.

**Schleis SE, LeBlanc AK, Nielsen NR, LeBlanc CJ.** Flow cytometric evaluation of multidrug resistance proteins on grossly normal canine nodal lymphocyte membranes. *Am J Vet Res.* 2008; 69:1310–1315.

**Schlotter CM, Tietze L, Vogt U, Heinsen CV, Hahn A.** Ki67 and lymphocytes in the pretherapeutic core biopsy of primary invasive breast cancer: positive markers of therapy response prediction and superior survival. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017; 22-32.

**Schmid I, Uittenbogaart C, Jamieson BD.** Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc* 2007; 2:187–197.

**Shapiro HM.** Practical Flow Cytometry, 3rd edition, pp. 237–248, 306–326. Wiley-Liss, Toronto, Ontario, Canada, 2003.

**Sharpe JC, Evans KM:** Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 2009; 71:4–10.

**Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, et al.** Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest.* 2018; 30:263–267.

**Smolewski P, Grabarek J, Halicka HD, Darzynkiewicz Z.** Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002; 265:111–121.

**Soares M, Ribeiro R, Carvalho S, Peleteiro M, Correia J, Ferreira F.** Ki-67 as a prognostic factor in feline mammary carcinoma: what is the optimal cutoff value? *Vet Pathol.* 2016; 53:37-43.

**Sofocleous CT, Garg SK, Cohen P, et al.** Ki 67 is an independent predictive biomarker of cancer specific and local recurrence-free survival after lung tumor ablation. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20Suppl3:S676-683.

**Sokołowska J, Micun J, Malicka E, Lechowski R.** Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol J Vet Sci.* 2012; 15:727-734.

**Sonea IM, Jergens AE, Sacco RE, et al.** Flow cytometric analysis of colonic and small intestinal mucosal lymphocytes obtained by endoscopic biopsy in the healthy dog. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 77:103–119.

**Stewart CC, Stewart SJ.** Immunophenotyping. *Curr Protoc Cytometry* 2010; 6:Unit 6.2.

**Stokol T, Nickerson GA, Shuman M, Belcher N.** Dogs with Acute Myeloid Leukemia Have Clonal Rearrangements in T and B Cell Receptors. *Front Vet Sci.* 2017; 31; 4:76.

**Striefler JK, Sinn M, Pelzer U, et al.** P53 overexpression and Ki67-index are associated with outcome in ductal pancreatic adenocarcinoma with adjuvant gemcitabine treatment. *Pathol Res Pract.* 2016; 212:726-734.

**Tagawa M, Shimbo G, Inokuma H, Miyahara K.** Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *J Vet Diagn Invest.* 2019 Oct 4:1040638719880245.

**Tarrant JM.** The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet J* 2005; 170:278–288.

**Tasca S, Carli E, Caldin M, Menegazzo L, Furlanello T, Gallego LS.** Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002–2006). *Vet Clin Pathol.* 2009; 38:2–12.

**Te Kronnie G, Bicciato S, Basso G.** Acute leukemia subclassification: a marker protein expression perspective. *Hematology.* 2004; 9:165–170.

**Teske E, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, van Dierendonck JH, van Heerde P, Cornelisse CJ.** DNA ploidy and cell kinetic characteristics in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol.* 1993; 21:579–584.

**Tung JW, Parks DR, Moore WA, Herzenberg LA, Herzenberg LA.** New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol.* 2004; 110:277–283.

**Usher SG, Radford AD, Villiers EJ, Blackwood L.** RAS, FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias. *Exp Hematol* 2009; 37:65–77.

**Vail DM, Young KM.** Canine lymphoma and lymphoid leukemia in: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (4th ed.), Saunders Elsevier, Saint Louis, Missouri, USA, 2007, pp. 699-733. By S.J. Withrow, D.M. Vail (Eds.).

**Valentini F, Tasca S, Gavazza A, Lubas G.** Use of CD9 and CD61 for the characterization of AML-M7 by flow cytometry in a dog. *Vet Comp Oncol.* 2012; 10:312-318.

**Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, et al.** Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. World Health Organization. Second series, Vol 8. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA., 2002.

**Valli VE, Kiupel M, Bienzle D.** Hematopoietic system In: *Pathology of domestic animals*, Vol 3, 6th edition, 2016, 102-268; edited by M. Grant Maxie

**Valli VE, San Myint M, Barthel A, et al.** Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol.* 2011; 48:198-211.

**Valli VE.** *Veterinary Comparative Hematopathology*, pp. 367–374. Blackwell, Ames, IA, 2007.

**van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al.** Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12): 2257–2317

**Vernau W, Moore PF.** An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 145–164.

**Villiers E, Baines S, Law AM, Mallows V.** Identification of acute myeloid leukemia in dogs using flow cytometry with myeloperoxidase, MAC387, and a canine neutrophil-specific antibody. *Vet Clin Pathol*. 2006; 35:55–71.

**Wang LW, Qu AP, Liu WL, et al.** Quantum dots-based double imaging combined with organic dye imaging to establish an automatic computerized method for cancer Ki67 measurement. *Sci Rep*. 2016; 6:20564.

**Weir E, Borowitz M.** Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 2001; 38:124–138.

**Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, et al.** Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 106:179–196.

**Williams MJ, Avery AC, Lana SE, Hillers KR, Bachand AM, Avery PR.** Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis. *J Vet Intern Med*. 2008; 2:596–601.

**Willmann M, Mullauer L, Guija de Arespachoga A, et al.** Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 128:359–365.

**Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al.** 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: S14–S22.

**Wright T, Brisson BA, Wood GA, et al.** Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. *Cytometry A.* 2019;9 5:997-1007.

**Wu D, Takahashi K, Liu N, et al.** Distribution of T-lymphocyte subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with enzootic bovine leukosis. *J Comp Pathol.* 1999; 120:117–127.

**Zeppa P, Marino G, Troncone G, et al.** Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer.* 2004; 25; 102:55-65.

### Parte III

**Ahluwalia A, Hurteau JA, Bigsby RM, Nephew KP.** DNA methylation in ovarian cancer. II. Expression of DNA methyltransferases in ovarian cancer cell lines and normal ovarian epithelial cells. *Gynecol Oncol.* 2001; 82:299-304.

**Asa'ad F, Bollati V, Pagni G, et al.** Evaluation of DNA methylation of inflammatory genes following treatment of chronic periodontitis: a pilot case-control study. *J Clin Periodontol* 2017;44(9):905-914.

**Badal V, Chuang LS, Tan EH, et al.** CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol.* 2003; 77:6227-6234.

**Ballestar E, Paz MF, Valle L, et al.** Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.* 2003; 22:6335-6345.

**Banlaki Z, Cimarelli G, Viranyi Z, Kubinyi E, Sasvari-Szekely M, Ronai Z.** DNA methylation patterns of behavior-related gene promoter regions dissect the gray wolf from domestic dog breeds. *Mol Genet Genomics.* 2017; 292:685-697.

**Baylin SB, Jones PA.** A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11:726-734.

**Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, et al.** A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003; 63:1727–1730.

**Brandão YO, Toledo MB, Chequin A, et al.** DNA Methylation Status of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene in Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.* 2018; 55:510-516.

**Cai WL, Huang WD, Li B, et al.** microRNA-124 inhibits bone metastasis of breast cancer by repressing Interleukin-11. *Molecular cancer* 2018; 17:9.

**Califano J, van der Riet P, Westra W, et al.** Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996; 56:2488–2492

**Cancer Genome Atlas N.** Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015; 517:576–582

**Cesaroni M, Powell J, Sapienza C.** Validation of methylation biomarkers that distinguish normal colon mucosa of cancer patients from normal colon mucosa of patients without cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014; 7:717-726.

**Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL.** The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 99:16916-16921.

**Choi JD, Lee JS.** Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics Inform.* 2013; 11:164-173.

**Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ.** The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2015; 15:103–113.

**Claus R, Lucas DM, Ruppert AS et al.** Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014 3; 124:42-48.

**de Faria Amormino SA, Arao TC, Saraiva AM, et al.** Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Human Immunobiol* 2013; 74:1231-1236.

**Del Portillo A, Komissarova EV, Bokhari A, et al.** Downregulation of Friend Leukemia Integration 1 (FLI1) follows the stepwise progression to gastric adenocarcinoma. *Oncotarget* 2019; 10:3852-3864.

**Demokan S, Chang X, Chuang A, et al.** KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses. *Intern journ of cancer* 2010; 127:2351-2359.

**Deplus R, Brenner C, Burgers WA et al.** Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:3831-3838.

**Dikova VR, Principe S, Bagan JV.** Salivary inflammatory proteins in patients with oral potentially malignant disorders. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2019; 11:659-664.

**Dolan J, Walshe K, Alsbury S, Hokamp K, O'Keeffe S, Okafuji T, Miller SF, TearG, Mitchell KJ.** The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics.* 2007 Sep 14;8:320.

**Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al.** MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28.

**Ehrlich M.** DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1:239-259.

**Epiphanio TMF, de Azevedo Fernandes NCC, de Oliveira TF, et al.** Global DNA methylation of peripheral blood leukocytes from dogs bearing multicentric non-Hodgkin lymphomas and healthy dogs: A comparative study. *PloS one* 2019; 14:e0211898.

**Esteller M.** Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethilome. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No 1, R50-R59, 2007.

**Esteller M.** Epigenetics in evolution and disease. *Lancet* 372, S90-S96, 2008.

**Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S.** The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:21-33.

**Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al.** Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet.* 2002; 31:175-179.

**Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B.** Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989; 83:155-8.

**Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, et al.** Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics* 2014; 9:1031-1046.

**Herman JG and Baylin SB.** Methylation-specific PCR. *Crr. Prot. Hum. Genet.* Chapter 10, Unit 10-6, 2001.

**Hsu CM, Lin PM, Wang YM, et al.** Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2012; 33:1933–1942.

**Huang Z, Zhu D, Wu L et al.** Six Serum-Based miRNAs as potential diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017; 26:188-196.

**Ishida K, Kobayashi T, Ito S, et al.** Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2012;83(7):917-925.

**Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA.** Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61:3573-3577.

**Jimi E, Shin M, Furuta H, Tada Y, Kusakawa J.** The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 2013; 42:803-809.

**Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics* 2002; 3:415-428.

**Kacem S, Feil R.** Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome.* 2009; 20:544-556.

**Kaneda A, Takai D, Kaminishi M, Okochi E, Ushijima T.** Methylation-sensitive representational difference analysis and its application to cancer research. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 983:131-141.

**Kato K, Hara A, Kuno T, et al.** Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2006; 132:735-743.

**Kawada T, Takahashi H, Sakakura K, et al.** Circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma: feasibility of detection and quantitation. *Head Neck.* 2017; 39:2180–2186.

**Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, et al.** Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:1010–1020.

**Kiupel M.** Mast Cell Tumor. In: D. Meuten “*Tumors of Domestic Animals*”, 5<sup>th</sup> edition, 2016, by Donald J. Meuten.

**Kulis M, Esteller M.** DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010; 70:27-56.

**Kulkarni V, Saranath D.** Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology* 2004; 40:145-153.

**Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, et al.** Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One.* 2009;4(9).

**Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Grandis JR, Sobol RW, Taioli E.** MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis* 2010;31(5):864-870.

**Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH.** The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18:269–282.

**Li E, Bestor TH, Jaenisch R.** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992; 69, 915–926.

**Li X, Fan Q, Li J, Song J, Gu Y.** MiR-124 down-regulation is critical for cancer associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral carcinoma. *Experimental cell research* 2017; 351:100-108.

**Li YF, Hsiao YH, Lai YH, et al.** DNA methylation profiles and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2015; 10:229-236.

**Lian Y, Meng L, Ding P, Sang M.** Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs. *Clinical epigenetics* 2018; 10:115.

**Lin RK, Hsu HS, Chang JW, Chen CY, Chen JT, and Wang YC.** Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5<sup>0</sup>CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*. 2007; 55:205–213.

**Lister R, Pelizzola M, Downen RH, et al.** Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009; 462, 315–322.

**Liu D, Ma X, Yang F, Xiao D, Jia Y, Wang Y.** Discovery and validation of methylated-differentially expressed genes in Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *Cancer Gene Ther*. 2019 Jul 16. doi: 10.1038/s41417-019-0125-7.

**Lopez-Serra L, Esteller M.** Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer*. 2008; 98:1881-1885.

**Lu YC, Chang JT, Huang YC, et al.** Combined determination of circulating miR-196a and miR-196b levels produces high sensitivity and specificity for early detection of oral cancer. *Clin Biochem*. 2015; 48:115–121

**Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al.** High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:989-995.

**Maiuri AR, O'Hagan HM.** Interplay between inflammation and epigenetic changes in cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2016; 144:69-117.

**Majem B, Rigau M, Reventos J, et al.** Non-coding RNAs in saliva: emerging biomarkers for molecular diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2015; 16:8676–8698.

**Marconato L, Buchholz J, Keller M, Bettini G, Valenti P, Kaser-Hotz B.** Multimodal therapeutic approach and interdisciplinary challenge for the treatment of unresectable head and neck squamous cell carcinoma in six cats: a pilot study. *Vet Comp Oncol* 2013; 11:101-112.

**Marconato L, Gelain ME, Comazzi S.** The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 2013; 31:1–9.

**Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, et al.** Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009; 30:416-422.

**Marur S, Forastiere AA.** Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016; 91:386–396.

may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989; 83:155-158.

**Mazurek AM, Rutkowski T, Fiszler-Kierzkowska A, et al.** Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2016; 54:36–41.

**Michalak EM, Burr ML, Bannister AJ, Dawson MA.** The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019; 20:573-589.

**Milicic A, Harrison LA, Goodlad RA, et al.** Ectopic expression of P-cadherin correlates with promoter hypomethylation early in colorectal carcinogenesis and enhanced intestinal crypt fission in vivo. *Cancer Res.* 2008; 68:7760–7768.

**Mishra R.** Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral oncology* 2012; 48:578-584.

**Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al.** Circulating microRNAs as stable blood- based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105: 10513–10518.

**Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, et al.** DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2015; 43:1494-1500.

**Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, et al.** CpG location and methylation level are crucial factors for the early detection of oral squamous cell carcinoma in brushing samples using bisulfite sequencing of a 13-gene panel. *Clinical epigenetics* 2017; 9:85.

**Morimoto CY, Tedardi MV, da Fonseca IIM, et al.** Evaluation of the global DNA methylation in canine mast cell tumour samples by immunostaining of 5-methyl cytosine. *Vet Comp Oncol.* 2017; 15:1014-1018.

**Mudaliar MA, Haggart RD, Miele G, et al.** Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- $\kappa$ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *PLoS One.* 2013 Sep 4;8(9):e72591.

**Müller S.** Oral lichenoid lesions: distinguishing the benign from the deadly. *Modern Pathology* 2017; 30, S54-S67.

**Nagarajan RP, Zhang B, Bell RJ, Johnson BE, Olshen AB, Sundaram V, Li D, Graham AE, Diaz A, Fouse SD, Smirnov I, Song J, Paris PL, Wang T, Costello JF.** Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome Res.* 2014; 24:761-774.

**Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L.** Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS genet* 2018; 14:e1007362.

**Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A.** Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47:908-918.

**Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al.** Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Research* 2010; 70:1430-1440.

**Noguchi S, Mori T, Nakagawa T, Itamoto K, Haraguchi T, Mizuno T.** DNA methylation contributes toward silencing of antioncogenic microRNA-203 in human and canine melanoma cells. *Melanoma Res.* 2015; 25:390-398.

**Nordentoft I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbæk M, et al.** miRNAs associated with chemosensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. *BMC Med Genomics.* 2011; 6:5-40.

**Ovchinnikov DA, Cooper MA, Pandit P, et al.** Tumor-suppressor gene promoter Hypermethylation in saliva of head and neck Cancer patients. *Transl Oncol.* 2012; 5:321–326.

**Paredes J, Albergaria, A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC.** P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 5869–5877.

**Pattani KM, Zhang Z, Demokan S, et al.** Endothelin receptor type B gene promoter hypermethylation in salivary rinses is independently associated with risk of oral cavity cancer and premalignancy. *Cancer Prevention Research* 2010; 3:1093-1103.

**Payne K, Spruce R, Beggs A, et al.** Circulating tumor DNA as a biomarker and liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2018; 40:1598–1604

**Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M.** A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2003; 63: 1114–1121.

**Peng XH, Huang HR, Lu J, et al.** MiR-124 suppresses tumor growth and metastasis by targeting Foxq1 in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* 2014; 13:186.

**Perdomo S, Avogbe PH, Foll M, et al.** Circulating tumor DNA detection in head and neck cancer: evaluation of two different detection approaches. *Oncotarget*. 2017; 8:72621–72632.

**Piegols HJ, Takada M, Parys M, Dexheimer T, Yuzbasiyan-Gurkan V.** Investigation of novel chemotherapeutics for feline oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9:33098-33109.

**Planello AC, Singhania R, Kron KJ, et al.** Pre-neoplastic epigenetic disruption of transcriptional enhancers in chronic inflammation. *Oncotarget* 2016; 7:15772-15786.

**Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL.** MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- $\alpha$ -PU. 1 pathway. *Nature medicine* 2011; 17:64-70.

**Portela A, Esteller M.** Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology* 2010; 28:1057-1068.

**Principe S, Hui AB, Bruce J, et al.** Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013; 13:1608–1623.

**Qiu H, Lin D.** Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci*. 2016;78:943-949.

**Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A.** Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *International Journal of Surgery* 2010; 8:194-219.

**Reik W, Lewis A.** Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet*. 2005; 6:403-410.

**Renzi A, De Bonis P, Morandi L, et al.** Prevalence of p53 dysregulations in feline oral squamous cell carcinoma and non-neoplastic oral mucosa. *PloS one* 2019; 14:e0215621.

**Ribeiro AS, Albergaria A, Sousa B, et al.** Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: A mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29:392–402.

**Ribeiro IP, Barroso L, Marques F, et al.** Early detection and personalized treatment in oral cancer: the impact of omics approaches. *Mol Cytogenet*. 2016; 9:85.

**Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, et al.** Genomic and epigenetic signatures associated with survival rate in oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer*. 2018; 9:1885–1895

**Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, et al.** Genomic predictive model for recurrence and metastasis development in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*. 2017; 7:13897.

**Ribeiro IP, Caramelo F, Marques F, et al.** WT1, MSH6, GATA5 and PAX5 as epigenetic oral squamous cell carcinoma biomarkers - a short report. *Cell Oncol.* 2016; 39:573–582

**Ribeiro IP, Marques F, Caramelo F, et al.** Genetic gains and losses in oral squamous cell carcinoma: impact on clinical management. *Cell Oncol.* 2014; 37:29–39.

**Ribeiro IP, Marques F, Caramelo F, et al.** Genetic imbalances detected by multiplex ligation-dependent probe amplification in a cohort of patients with oral squamous cell carcinoma-the first step towards clinical personalized medicine. *Tumour Biol.* 2014; 35:4687–4695.

**Ribeiro IP, Rodrigues JM, Mascarenhas A, et al.** Cytogenetic, genomic, and epigenetic characterization of the HSC-3 tongue cell line with lymph node metastasis. *J Oral Sci.* 2018; 60:70–81.

**Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, et al.** Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:1179–1185.

**Roh JL, Westra WH, Califano JA, Sidransky D, Koch WM.** Tissue imprint for molecular mapping of deep surgical margins in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34:1529-1536.

**Roll JD, Rivenbark AG, Jones WD, Coleman WB.** DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer.* 2008; 7: 15.

**Rush LJ, Plass C.** Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: Past, present, and future applications. *Anal. Biochem.* 2002; 307: 191–201.

**Sakurai T, Kondoh N, Arai M, et al.** Functional roles of Fli-1, a member of the Ets family of transcription factors, in human breast malignancy. *Cancer Sci* 2007; 98:1775-1784.

**Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al.** Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2000; 60:892–895.

**Savoia A, Pastore A, De Rocco D, et al.** Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica.* 2011; 96:417-23.

**Schrock A, Lisse A, de Vos L, et al.** Free-circulating methylated DNA in blood for diagnosis, staging, prognosis, and monitoring of head and neck squamous cell carcinoma patients: an observational prospective cohort study. *Clin Chem.* 2017; 63:1288–1296.

**Schussel J, Zhou XC, Zhang Z, et al.** EDNRB and DCC salivary rinse hypermethylation has a similar performance as expert clinical examination in discrimination of oral cancer/dysplasia versus benign lesions. *Clinical Cancer Research* 2013; 19:3268-3275.

**Sepulveda JL, Gutierrez-Pajares JL, Luna A, et al.** High-definition CpG methylation of novel genes in gastric carcinogenesis identified by next-generation sequencing. *Mod Pathol* 2016; 29:182-193.

**Sethi S, Benninger MS, Lu M, et al.** Noninvasive molecular detection of head and neck squamous cell carcinoma: an exploratory analysis. *Diagn Mol Pathol.* 2009; 18:81–87.

**Sheffield NC, Pierron G, Klughammer J, et al.** DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat Med* 2017; 23:386-395.

**Shin YJ, Choung HW, Lee JH, Rhyu IC, Kim HD.** Association of Periodontitis with Oral Cancer: A Case-Control Study. *Journal of dental research* 2019; 98:526-533.

**Siegel RL, Miller KD, Jemal A.** Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66:7–30

**Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W.** Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953; 6:963–968.

**Song W, Li W, Li L, et al.** Friend leukemia virus integration 1 activates the Rho GTPase pathway and is associated with metastasis in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6:23764-23775.

**Spafford MF, Koch WM, Reed AL, et al.** Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:607–612.

**Spruijt CG, Vermeulen M.** DNA methylation: old dog, new tricks?. *Nature structural & molecular biology* 2014;21(11):949-954.

**Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, et al.** Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2000; 20:5643-5652.

**Stadler ME, Patel MR, Couch ME, et al.** Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008; 22:1099– 1124.

**Stein RA.** Epigenetics-the link between infectious diseases and cancer. *JAMA* 2011; 305:1484-1485.

**Studer E, Stapley RB.** The role of dry food in maintaining healthy teeth and gums in the cat. *Vet Med Small Anim Clin* 1973; 68:1124-1126.

**Supravhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ.** Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *The Veterinary Journal* 2016; 210:7-16.

**Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al.** Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324: 930–935.

**Takacs M, Banati F, Koroknai A, et al.** Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim. Biophys.* 2010; 79:228–235.

**Takehima H, Ushijima T.** Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ Precision Oncology* 2019; 3:7.

**Tangutoori S, Baldwin P, Sridhar S.** PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas* 2015; 81:5-9.

**Tannehill-Gregg SH, Levine AL, Rosol TJ.** Feline head and neck squamous cell carcinoma: a natural model for the human disease and development of a mouse model. *Vet Comp Oncol* 2006; 4:84-97.

**Tezal M, Sullivan MA, Hyland A, et al.** Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 2009; 18:2406-2412.

**Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, et al.** CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature*. 2010; 464:1082-1086.

**Truong AH, Ben-David Y.** The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000; 19:6482-6489.

**Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P.** Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*. 2002; 23: 4072–4079.

**Veerla S, Panagopoulos I, Jin Y, Lindgren D, Hoglund M.** Promoter analysis of epigenetically controlled genes in bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47: 368–378.

**Vo KK, Jarocho DJ, Lyde RB, et al.** FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology. *Blood* 2017; 129:3486-3494.

**Vozdova M, Kubickova S, Fictum P, Cernohorska H, Fröhlich J, Rubes J.** Mutation and methylation status of KIT and TP53 in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2019 Oct 1. doi: 10.1111/vco.12543.

**Vrba L, Futscher BW.** A suite of DNA methylation markers that can detect most common human cancers. *Epigenetics* 2018; 13:61-72.

**Vymetalkova V, Vodicka P, Pardini B, et al.** Epigenome-wide analysis of DNA methylation reveals a rectal cancer-specific epigenomic signature. *Epigenomics* 2016; 8:1193-1207.

**Waddington CH.** Introduction to modern genetics. Macmillan, 1939.

**Wang Y, Springer S, Mulvey CL, et al.** Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015; 7:293.

**Withrow SJ, Liptak JM.** Cancer of the gastrointestinal tract. In: Withrow SJ, Vail DM, Page RL, ed. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2013:381-383.

**Wypij JM.** A naturally occurring feline model of head and neck squamous cell carcinoma. *Patholog Res Int* 2013; 2013:502197.

**Yamazaki J, Jelinek J, Hisamoto S, Tsukamoto A, Inaba M.** Dynamic changes in DNA methylation patterns in canine lymphoma cell lines demonstrated by genome-wide quantitative DNA methylation analysis. *The Veterinary Journal* 2018; 231:48-54.

**Yang CC, Hung PS, Wang PW, et al.** miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40:397–404.

**Zamunér FT, Karia BTR, de Oliveira CZ, dos Santos CR, Carvalho AL, Vettore AL.** A comprehensive expression analysis of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinoma reveals MAGEA3/6 as a marker for recurrence. *Molecular cancer therapeutics* 2015; 14:828-834.

**Zhang S, Crivello A, Offenbacher S, Moretti A, Paquette DW, Barros SP.** Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37:953-961.

**Zhang S, Barros SP, Moretti AJ et al.** Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. *J Periodontol* 2013; 84:1606-1616.

**Zhao Y, Ling Z, Hao Y, et al.** MiR-124 acts as a tumor suppressor by inhibiting the expression of sphingosine kinase 1 and its downstream signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8:25005-25020.

**Zimmermann BG, Park NJ, Wong DT.** Genomic targets in saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;  
1098:184–191.