

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Dottorato di ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale

Progetto n° 1 "Oncologia"

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sandro Gilli

***CARATTERIZZAZIONE GENETICO-
FUNZIONALE DEL CARCINOMA MAMMARIO***

Valutazione Dell'espressione Di NIS

(Natrium/Iodide Symporter)

***Presentata dalla dott.ssa
Anna Farnedi***

***Relatore Chiar.mo
Prof. Vincenzo Eusebi***

A.A. 2006-2007

CARATTERIZZAZIONE GENETICO-FUNZIONALE DEL CARCINOMA MAMMARIO

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI NIS

(Natrium/Iodide Symporter)

Introduzione

Il carcinoma mammario

Il carcinoma mammario è la neoplasia maligna che più frequentemente conduce a morte nel sesso femminile e costituisce, circa, il 30% delle neoplasie che colpiscono le donne [1]. Al contrario, si tratta di una neoplasia estremamente rara nel sesso maschile (1% delle neoplasie maligne che colpiscono gli uomini).

Recentemente, si è assistito ad un incremento, nelle statistiche, dell'incidenza del carcinoma mammario, probabilmente causato dall'introduzione di programmi di screening che consentono la diagnosi delle neoplasie anche di piccole dimensioni. La mortalità dovuta al carcinoma mammario è rimasta sostanzialmente invariata dagli anni '30 agli anni '90. Nell'ultimo decennio, invece, appare essersi leggermente ridotta grazie, molto probabilmente, alla possibilità di diagnosi precoce e all'utilizzo di terapie mirate su base ormonale e genetica.

Epidemiologia

Come per molti tipi di patologie, anche per il carcinoma mammario è stata individuata una serie di fattori predisponenti:

- Fattori geografici: estremamente frequente nei paesi industrializzati, quali Stati Uniti, Europa Occidentale ed Australia, dove circa il 6% della popolazione femminile sviluppa un carcinoma mammario entro il 75° anno di età. Al contrario, è più raro nei paesi non industrializzati, quali Africa e Sud Est Asiatico, dove il rischio di sviluppare un carcinoma mammario è circa un terzo

di quello dei paesi industrializzati [2]. L'unico Paese industrializzato che sembra avere bassa incidenza di carcinoma mammario è il Giappone.

- Fattori riproduttivi: maggiore frequenza in donne con menarca precoce, nullipare o con prima gravidanza in età superiore ai 30 anni.
- Fattori familiari: la presenza di una parente di primo grado (madre o sorella) con carcinoma mammario rende doppio il rischio di sviluppare il carcinoma mammario rispetto alla popolazione generale. Anche se, solitamente, nei soggetti con predisposizione familiare il carcinoma compare in età giovanile (prima dei 40 anni) ed è più frequentemente bilaterale [3].
- Predisposizione genetica: è stato dimostrato che pazienti affetti da mutazioni a livello dei geni BRCA1 (17q) e BRCA2 (12q) hanno un aumentato rischio di sviluppare carcinoma mammario, entro i 70 anni, del 56% circa. Le mutazioni a livello di questi geni sono responsabili di circa 1/3 dei casi familiari e, complessivamente, del 5% circa dei casi di carcinoma mammario. Le mutazioni a carico del gene BRCA1 sono, inoltre, coinvolte nella predisposizione allo sviluppo di carcinomi all'apparato riproduttivo femminile (ovaio e tube).
- Contraccettivi orali: è stato dimostrato un modesto aumento di rischio in donne giovani a seguito di assunzione protratta di estrogeni e progestinici a fini contraccettivi.
- Terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa: come nel caso della contraccezione orale, è stato dimostrato un lieve aumento di rischio in casi di assunzione per 5 anni. Nei casi di periodi più lunghi, i dati non sono concordanti.
- Fattori nutrizionali: il consumo di frutta e vegetali freschi sembra avere un ruolo protettivo, mentre sembra produrre un aumento del rischio il consumo di carni, soprattutto rosse, ma i dati sono ancora discordanti a riguardo. Anche un abbondante consumo di alcool sembra essere correlato con un lieve aumento di rischio.
- Fumo: non esistono, finora, dati riproducibili che correlino il fumo di tabacco con l'insorgenza di carcinoma mammario.
- Obesità: l'aumento del peso corporeo, soprattutto, ma non solo, in età post-menopausale, determina un incremento del rischio di insorgenza di carcinoma

mammario probabilmente dovuto all'aumento dei livelli sierici di testosterone nelle donne in sovrappeso, rischio legato alla maggior concentrazione di ormoni steroidei a livello del tessuto adiposo.

- Attività fisica: sembra che le donne che fanno attività fisica in maniera regolare abbiano una riduzione del rischio di sviluppare un carcinoma mammario fino al 40%.

Diagnosi

Indubbiamente l'esame clinico, basato sulla *palpazione*, costituisce il metodo di diagnosi più antico, ma ancora valido. La sua sensibilità, tuttavia, è piuttosto bassa poichè permette di rilevare solo il 60% delle lesioni, se paragonato alla mammografia. La palpazione permette, inoltre, di rilevare un eventuale nodulo ma non di discriminare con certezza tra noduli benigni (es: fibroadenomi) e maligni. Analogamente, la sola valutazione clinica dei linfonodi ascellari può portare a sovra o sottostime.

La *mammografia* permette di diagnosticare noduli inferiori al centimetro di diametro e, quindi, non palpabili. E' un'indagine utile soprattutto nelle donne sopra i 35 anni, prima, infatti, le caratteristiche fisiologiche del tessuto mammario rendono difficoltosa l'interpretazione delle lastre a causa della predominanza del tessuto fibroso. Inoltre, non è opportuno indagare tramite mammografia il seno di donne in giovane età, dato il rischio connesso all'irradiazione con raggi X prolungato negli anni. Da dati presenti in letteratura [4] si può rilevare che la mammografia è una tecnica ottimale per l'individuazione di lesioni che provocano un addensamento del tessuto mammario o la formazione di microcalcificazioni.. Al contrario, tumori che non si comportano in questa maniera (es: carcinoma lobulare *in situ* e infiltrante) possono sfuggire all'esame mammografico. Negli ultimi anni si è introdotta, anche se per il momento non su larga scala, a livello di screening, la risonanza magnetica nucleare (RMN) come metodo di diagnosi nel caso di pazienti con un alto rischio accertato (familiare o genetico) [5]. A queste indagini va ad aggiungersi la necessità di indagini citologiche o istologiche delle lesioni, una volta individuate con i metodi precedentemente descritti.

Classificazione

Lo spettro degli aspetti morfologici del carcinoma mammario si è modificato, nel corso degli ultimi anni, soprattutto in seguito all'introduzione dei programmi di screening ed all'applicazione di indagini di immunoistochimica e di biologia molecolare che hanno aumentato le conoscenze sulle varie forme di neoplasie mammarie. La classificazione a cui, a livello internazionale, si fa riferimento oggi è la classificazione **WHO 2003** [2].

Fattori prognostici

I criteri prognostici di maggiore importanza sono: il *grado istologico* e lo *stadio della neoplasia alla presentazione*.

Grado istologico o grading: si basa sulla valutazione della neoformazione di ghiandole, del pleomorfismo nucleare e del numero di mitosi:

1. **Formazione di ghiandole**: si definiscono come strutture con un lume centrale, delineate da cellule neoplastiche. Si assegna un punteggio di **1**, quando più del 75% del tumore forma ghiandole; **2**, quando le ghiandole costituiscono dal 10 al 75% del tumore; **3**, quando sono meno del 10% della neoplasia.
2. **Pleomorfismo nucleare**: viene valutato sulla base di forma e dimensioni del nucleo e sulla presenza del nucleolo. Si assegna un punteggio di **1**, ai nucleo meno pleomorfi (aspetto abbastanza omogeneo e regolare), **2**, quando compare un nucleolo visibile, **3**, quando è presente un marcato pleomorfismo nucleare e molteplici nucleoli.
3. **Mitosi**: si contano le mitosi su 10 campi microscopici a forte ingrandimento. Si assegna un punteggio di **1**, quando le mitosi sono inferiori a 12; **2**, quando sono tra 12 e 23; **3**, quando sono più di 23.

Sommando i punteggi si ottiene il grado che viene classificato come segue:

- GX: non valutabile
- G1: punteggio totale tra **3** e **5**; *buona prognosi*.
- G2: punteggio totale compreso tra **6** e **7**: *prognosi incerta*
- G3: punteggio totale compreso tra **8** e **9**; *prognosi sfavorevole*

Stadio o staging: la determinazione dello stadio raggiunto dalla neoplasia alla presentazione è importante per impostare programmi terapeutici sia chirurgici che radio e/o chemioterapici. La stadiazione viene eseguita seguendo protocolli che tengono conto delle più recenti acquisizioni scientifiche. Attualmente, per le neoplasie mammarie, si fa riferimento al sistema “TNM” adottato dall’American Joint Committee on Cancer (AJCC) nel 2002 [6]. Tale sistema si basa su:

- ❑ **Dimensioni della neoplasia (T)**
- ❑ Presenza ed estensione delle **metastasi ai linfonodi regionali (N)**
- ❑ Presenza di eventuali **metastasi a distanza (M)**

Dimensioni della neoplasia

Le dimensioni del tumore costituiscono un fattore prognostico indipendente molto importante. Uno dei vantaggi che comporta lo screening mammografico consiste proprio nella possibilità di riconoscere e identificare lesioni di dimensioni inferiori a quelli diagnosticati con la sola clinica (il 52% dei carcinomi identificati con mammografia ha dimensioni inferiori a 2 cm di asse maggiore, contro il 26% soltanto per i casi in cui non è stato attuato lo screening mammografico). Un aspetto che può esemplificare l’importanza delle dimensioni del tumore è il dato, confermato dalla letteratura, che la sopravvivenza a 20 anni per i carcinomi di dimensioni inferiori ad 1 cm è dell’86%, mentre scende al 69% per le neoplasie comprese tra 1.1 e 2 cm. Alle dimensioni della neoplasia è correlata anche l’incidenza delle metastasi linfonodali.

Metastasi linfonodali

Le condizioni dei linfonodi regionali costituiscono uno dei fattori prognostici di maggiore importanza. Infatti le recidive compaiono nel 70% circa delle pazienti con metastasi linfonodali già identificabili alla presentazione, contro il 20-30% circa delle pazienti senza metastasi linfonodali. Inoltre, nelle neoplasie di piccole dimensioni (inferiori a 2 cm. di asse maggiore), la sopravvivenza a 5 anni diminuisce con l’aumentare del numero di linfonodi metastatici, passando dal 87.4% nelle pazienti con 1-3 linfonodi metastatici al 66% nelle pazienti con più di 4 linfonodi coinvolti. Tuttavia, dai dati presenti in letteratura, emerge che anche le donne che non hanno metastasi linfonodali al momento dell’escissione del tumore, possono presentare ricadute di

malattia, anche se in misura minore. Questa osservazione ha spinto all'applicazione di tecniche immunoistochimiche anche sul tessuto linfonodale che potessero mettere in luce iniziali depositi metastatici composti da piccoli aggregati di cellule neoplastiche, altrimenti non identificabili. A questo proposito, risulta essere molto importante la valutazione delle condizioni del *linfonodo sentinella* (primo linfonodo cui perviene la linfa di drenaggio di una determinata neoplasia), in quanto lo stato di quest'ultimo può essere un riferimento verosimile dello stato di tutti i linfonodi regionali, dando così un'informazione generale senza dover ricorrere all'asportazione del cavo ascellare, compromettendo il drenaggio linfatico della paziente in maniera definitiva.

Indicatori di risposta alla terapia

I fattori prognostici indicati nel sistema TNM sono utili per prevedere la prognosi delle singole neoplasie. Accanto ad essi vengono, attualmente utilizzati altri fattori che sono utili come indicatori di risposta alla terapia.:

- **Recettori ormonali (estrogeni e progesterone)**, la cui valutazione è considerata estremamente importante per prevedere la risposta alla terapia ormonale: l'NIH (National Institute of Health) americano ha, infatti, stabilito [7] che la terapia ormonale deve essere somministrata solo alle donne che presentano una lesione che esprima i recettori per estrogeno e progesterone. Questi recettori si localizzano nel nucleo delle cellule [fig. 1].

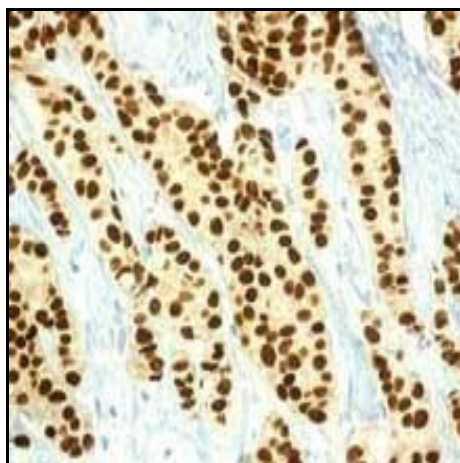


Fig.1, circa il 60% dei carcinomi invasivi presenta una positività intensa ai recettori estrogenici-progestinici.

L'assenza dell'espressione di questi recettori è solitamente caratteristica dei carcinomi scarsamente differenziati, di grado 3.

- **Indice di proliferazione cellulare** valuta la % di cellule che sono in ciclo cellulare, mediante colorazione immunohistochimica con siero anti-Ki67. La proteina Ki67 si localizza nel nucleo delle cellule che sono in ciclo replicativo. Solitamente i carcinomi scarsamente differenziati, che hanno una bassa espressione di recettori, hanno anche un alto indice di proliferazione cellulare.
- **Invasione vascolare**, la cui presenza è frequentemente associata a metastasi linfonodali. In assenza di queste ultime, il riscontro di infiltrazione neoplastica di vasi linfatici o ematici è indicativo di recidiva.
- **HER2/NEU**: gene localizzato sul cromosoma 17. Codifica per una proteina transmembrana di 185kDa, simile ad EGFR. Il suo ruolo come indicatore di risposta all'immunoterapia ha assunto importanza sempre maggiore a partire dalla fine degli anni '80 [8,9]. Ad oggi, la valutazione di HER2/NEU viene eseguita tramite immunohistochimica (*espressione*) o tramite indagine FISH, Fluorescent In Situ Hybridization (*amplificazione genica*) [fig.2].

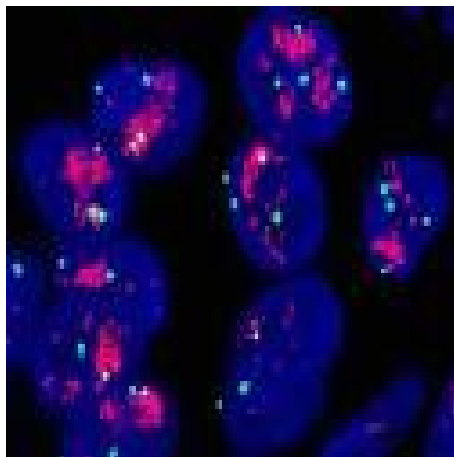


Fig.2, esempio di amplificazione genica del gene HER2 (in verde gli spot che rappresentano il cromosoma 17, sede del gene, e in rosso, in questo caso "a zolle", data l'amplificazione, gli spot che rappresentano il gene stesso.)

Terapia

A livello epidemiologico, il carcinoma mammario rappresenta circa 1/3 delle nuove diagnosi di neoplasia formulate ogni anno nel Nord America., mentre la sua incidenza annuale in Italia si attesta circa attorno ai 130 nuovi casi ogni 100.000 all'anno. Questi dati rendono quest'entità una chiara patologia a forte impatto sociale. Nell'ottica dell'importanza che questo tipo di neoplasia ha assunto, si sono moltiplicati i protocolli di screening che, a oggi, raccolgono ottimi risultati in termini di riduzione sensibile della mortalità. Riduzione dovuta all'aumento del numero di lesioni individuate precocemente e, quindi, più facilmente curabili.

I risultati ottenuti fino ad oggi nella lotta contro il carcinoma della mammella possono essere visti come l'esempio più paradigmatico di come l'integrazione multidisciplinare fra chirurghi, patologi, biologi, oncologi e radioterapisti produca una ricaduta benefica significativa sulla salute pubblica.

Le terapie adottate variano a seconda della tipologia e della gravità del caso:

□ La chemioterapia primaria

La chemioterapia primaria o “*neo-adiuvante*” ha un diffuso utilizzo e impatta favorevolmente sulla percentuale d'interventi conservativi coronati da successo, rispetto agli approcci tradizionali (chirurgia seguita da chemioterapia). L'ottenimento della completa scomparsa del tumore, indotto dalla chemioterapia primaria si traduce in una significativa riduzione del rischio di recidiva locale, oltre a rappresentare un vero e proprio “test di chemiosensibilità in vivo”; quest'ultima possibilità potrebbe, nel prossimo futuro, farle assumere un ruolo rivoluzionario, grazie alla possibilità di definire il profilo “genetico-funzionale” del tumore, identificando le lesioni che correlano con la maggiore probabilità di ottenere una risposta clinica ad un farmaco piuttosto che ad un altro.

□ La terapia della fase metastatica

Oltre il 50% delle pazienti con linfonodi positivi e circa il 20% delle pazienti con linfonodi negativi sono, nonostante la terapia neo-adiuvante, destinate a sviluppare una ripresa di malattia locale o, più frequentemente, a distanza. Il carcinoma mammario metastatico resta a tutt'oggi una patologia da cui è difficile guarire, per la quale è comunque possibile, con i trattamenti chemioterapici e/o ormonoterapici ottenere un significativo prolungamento della

sopravvivenza ed una importante riduzione dell'entità e della frequenza di comparsa delle complicanze legate alla malattia, con importante ricaduta benefica sulla qualità di vita delle pazienti. La scelta del trattamento farmacologico da somministrare come prima linea è influenzato da numerose variabili cliniche e biologiche espresse dalla paziente. Considerando che la sopravvivenza media delle pazienti che sviluppano una malattia metastatica oscilla tra i 24 e i 48 mesi, è chiaro come la scelta debba favorire l'efficacia del trattamento, ma anche e soprattutto debba tenerne in considerazione la tossicità, al fine di rispettare il più possibile la qualità di vita della paziente; ove possibile, pertanto, la prima scelta di trattamento deve essere riservata ai farmaci ormonali, caratterizzati dal profilo di tossicità più favorevole.

Le terapie “mirate”

Negli ultimi 20 anni si è assistito ad un'esplosione delle conoscenze nel campo della biologia tumorale, frutto dell'enorme sviluppo delle biotecnologie applicate alla ricerca oncologica. Per la prima volta i ricercatori hanno avuto a disposizione una serie di tecniche sempre più sofisticate per studiare i geni, i loro prodotti proteici, i vari aspetti del ciclo cellulare, la trasmissione dei segnali fra le cellule e le interazioni fra cellula e cellula.

Grazie all'identificazione di molecole che interagiscono con un difetto specifico, l'approccio alla farmacologia antineoplastica è radicalmente cambiato, passando da una farmacologia basata sulla malattia ad una terapia trasversale indirizzata sul difetto molecolare. In questo ambito, il ruolo dei fattori prognostici assume nuova rilevanza dal momento che alcuni di questi possono fornire utili indicazioni sulle scelte terapeutiche individualizzate per il singolo paziente.

Mediante indagini immunoistochimiche, immunoenzimatiche, di ibridazione in situ (FISH e CISH) e di analisi delle mutazioni geniche è possibile stabilire, non solo l'espressione delle numerose proteine implicate nel metabolismo delle cellule tumorali, ma anche il loro stato di attività o inattività. Nel carcinoma mammario non operato è quindi possibile valutare, su campioni tumorali ottenuti mediante core-biopsy, lo stato di relativa attività delle vie di proliferazione ed apoptosi in condizioni basali. Il modello della terapia primaria offre anche la possibilità di determinare l'effetto che su tali vie (e

sui singoli punti di regolazione del sistema) svolgono i trattamenti farmacologici, sia convenzionali che con molecole “*target-directed*”, confrontando i risultati delle indagini eseguite sul tessuto prelevato al momento della chirurgia con quelli ottenuti sul basale. Numerosi farmaci “*target-directed*”, alcuni dei quali ancora in via di sviluppo, hanno dimostrato di inibire efficacemente la crescita di tumori mammari, sia *in vitro* che *in vivo*. Dati in tal senso sono stati ottenuti con farmaci che, in terapia primaria in associazione a chemioterapici, hanno indotto, nei tumori con overespressione di HER2, un elevato numero di risposte complete [10, 11, 12].

Altre molecole, sono in corso di valutazione nel trattamento dei tumori mammari, sebbene siano ancora non completamente definiti i rapporti fra espressione ed inibizione del target molecolare e risposta clinica. Un’analisi di questi aspetti appare quindi di estrema importanza, ed il modello fornito dalla terapia primaria del carcinoma mammario offre ancora una volta il setting ideale per eseguire tale studio.

Nuove molecole bersaglio

Nel prossimo futuro il trattamento medico delle neoplasie diventerà dunque sempre più specifico e selettivo, guidato dalle caratteristiche biologiche del tumore, con evidenti vantaggi in termini di attività antitumorale e di ridotti effetti collaterali. Le nuove terapie biologiche, attualmente testate in pazienti con malattia avanzata, si presume possano essere più attive come trattamenti adiuvanti, per prevenire cioè le recidive dopo la chirurgia radicale.

I dati che arrivano dalla recente ricerca clinica mostrano la possibilità di impiegare un’ampia gamma di agenti indirizzati sui differenti bersagli molecolari: anticorpi monoclonali diretti al dominio extracellulare dei recettori per l’Epidermal Growth Factor (EGFR) di tipo 1 e 2; composti quinazolinici, specifici inibitori delle proteine tirosin-chinasi associate all’EGFR; agenti specifici per l’inibizione della tirosin-chinasi associata al recettore c-kit; inibitori della farnesilazione dell’oncoproteina Ras; oligonucleotidi antisenso che interferiscono con l’mRNA della Protein Kinasi C; modulatori della trascrizione che agiscono inibendo la deacetilazione degli istoni. Rimane indubbio che, per ora, è difficile stabilire se i nuovi farmaci non chemioterapici saranno in grado di cambiare significativamente la prognosi delle neoplasie maligne non ematologiche.

Tra le nuove possibili strategie terapeutiche vi è l'impiego di tali agenti per tempi prolungati con l'obiettivo di "cronicizzare" la malattia neoplastica attraverso una protratta inibizione della crescita tumorale senza pretendere la completa regressione della malattia. La rapida riduzione della massa tumorale che avviene talvolta impiegando la chemioterapia è infatti invariabilmente seguita da una inesorabile ripresa che porta al decesso del paziente.

I nuovi farmaci antitumorali potrebbero, invece, produrre un allungamento della sopravvivenza del malato oncologico, interferendo solo con la crescita e la diffusione del tumore, senza produrre importanti tossicità e senza compromettere la qualità della vita del paziente. A questo proposito sembra necessario modificare il disegno degli studi prevedendo, nella valutazione, più che il tasso di risposta alla terapia, il tempo alla progressione e il beneficio clinico.

Inoltre, i futuri studi clinici dovranno essere "disegnati" non solo per ottenere una valutazione dell'efficacia dei farmaci ma anche per individuare i determinanti biologici e molecolari della malattia e le caratteristiche genetiche del paziente predittivi della risposta al trattamento. Questo potrebbe consentire di ampliare lo spettro delle strategie terapeutiche antineoplastiche e, al contempo, di specializzare l'intervento terapeutico interferendo con specifici meccanismi coinvolti nella patogenesi molecolare di ogni determinata neoplasia e arrivare, attraverso i progressi della farmacogenomica, a individualizzare la terapia stessa.

NIS (Natrium Iodide Symporter)

La molecola conosciuta con questo nome è una glicoproteina transmembrana [fig.3] che consente il trasporto attivo di I^- all'interno delle cellule follicolari della tiroide. L'importanza di questa molecola è stata messa in evidenza da vari studi a partire dai primi anni novanta [13-15] e da allora sono state compiute molte ricerche che hanno permesso di conoscerne la maggior parte delle caratteristiche [16-18].

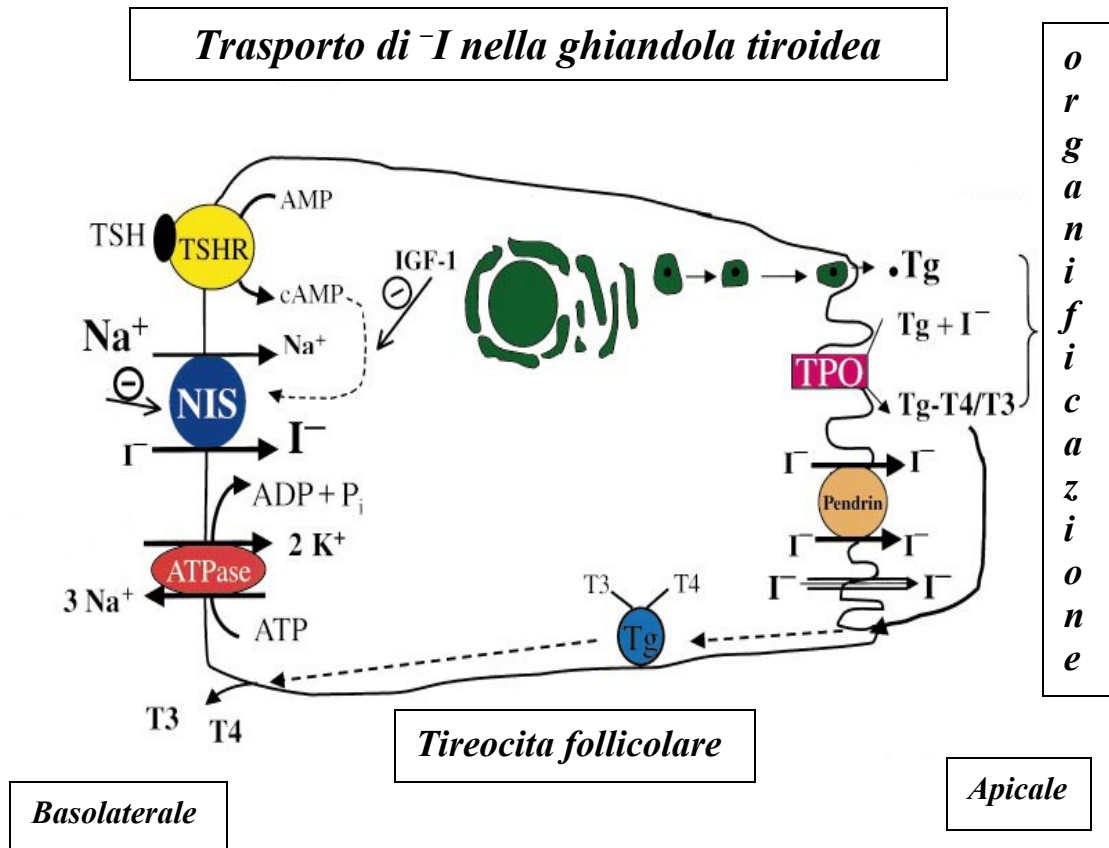


Fig.3, rappresentazione schematica di un tireocita follicolare che mostra gli aspetti chiave del trasporto dello I^- tiroideo e della sintesi degli ormoni. TSHR, TSH-receptor; NIS, Sodium Iodide Symporter; TPO, perossidasi tiroidea; Tg, tireoglobulina [16].

In sintesi, il NIS è una proteina intrinseca di membrana che media il trasporto attivo di Iodio nella tiroide e in altri tessuti, come le ghiandole salivari, la mucosa gastrica [18]. Il NIS gioca un ruolo chiave nella “pato-fisiologia” della tiroide in quanto rappresenta la via attraverso la quale si attua il primo passo verso la sintesi degli ormoni tiroidei. E’

inoltre, una molecola di fondamentale importanza per la diagnostica tramite scintigrafia e per la terapia radioiodio nell'ipertiroidismo e nei casi di carcinoma tiroideo.

La caratterizzazione molecolare del NIS è cominciata nel 1996 con l'isolamento di un cDNA che codificava per il NIS di ratto [19] ed è continuata per il ventennio successivo con scoperte di sempre maggior importanza. Sono stati sintetizzati anticorpi anti-NIS che hanno permesso lo studio della sua precisa localizzazione e della sua struttura secondaria; sono stati studiati i meccanismi di sintesi e le modificazioni post-traduzionali; è stato isolato il cDNA codificante per la proteina umana hNIS; sono state comprese le caratteristiche della sua organizzazione genomica, della sua regolazione tramite la *tireotropina* e lo I^2 , la regolazione della sua trascrizione ed, inoltre, sono state identificate le mutazioni spontanee che stanno alla base dei difetti congeniti a livello del trasporto dello Iodio e che causano le varie forme di ipotiroidismo. [21-24].

La conoscenza sempre più approfondita di questa molecola ha portato vari gruppi a concentrarsi anche su altri aspetti del ruolo del NIS:

- *Il NIS nei tessuti extratiroidei*: nel corso degli ultimi 10 anni, sono state utilizzate varie tecniche di indagine per l'individuazione del NIS nei vari tessuti extratiroidei (immunoistochimica, Northern blot e RT-PCR). In particolare, studi di immunoistochimica hanno messo in evidenza la presenza della proteina NIS nelle cellule degli acini delle ghiandole salivari umane e delle superfici parietali ed epiteliali dello stomaco di ratto [22-25]. Anche studi di RT-PCR hanno messo in evidenza dati simili, confermando la presenza del trascritto del gene hNIS in: ghiandole salivari, ipofisi, pancreas, testicoli, ghiandola mammaria, mucosa gastrica, prostata e ovaie. Non è stato, invece, individuato nei fibroblasti orbitali, nel colon e nella mucosa nasofaringea [21, 26]. Tenuto in considerazione il rischio di avere molti falsi positivi nelle indagini attuate con RT-PCR dovuti all'alta sensibilità di questa tecnica [27], sono prevalsi gli studi di immunoistochimica per l'analisi di questa e di altre molecole, non solo a causa della maggior veridicità dei risultati ma anche per la possibilità, propria dell'immunoistochimica stessa, di meglio identificare la localizzazione delle molecole ricercate.

- ***Il NIS nelle lesioni neoplastiche:*** per approfondire questo argomento è necessario fare un accenno sulla terapia radio-iodio, terapia che sta alla base dell'interesse per questa molecola.
 - La terapia con iodio radioattivo (^{131}I) è stata utilizzata per molti anni nel trattamento delle metastasi da carcinoma tiroideo. Messa a confronto con altre terapie anticancro, quella a base di ^{131}I è risultata essere semplice da gestire, ha dimostrato di avere tossicità minima ed elevata efficacia nella limitazione della crescita delle cellule tumorali [24]. La tiroide, oltre ad essere l'unico organo che, oltre ad accumulare lo ^{-}I , lo organifica nella sintesi della tireoglobulina, è stata anche, finora, il bersaglio ideale di questo tipo di terapia poichè, per l'organificazione dello ^{-}I , le sue cellule sono in grado di trattenere le molecole di I^2 , anche radioattivo, per periodi prolungati, consentendo così una maggior efficacia del trattamento radioattivo in maniera "naturale". Anche altri tessuti che esprimono NIS, come le ghiandole salivari e lo stomaco, sembrano essere in grado di concentrare al loro interno lo ^{-}I ma non di trattenerlo per periodi prolungati. La mancata capacità di prolungare la permanenza delle molecole di ^{131}I all'interno delle cellule sembra essere la causa della inefficacia della terapia radio-iodio nelle lesioni derivanti da questi organi. E' stato, comunque, dimostrato, in cellule di carcinoma prostatico esprimenti NIS esogeno, a seguito di trasfezione genica tramite adenovirus, che è possibile ottenere sia un aumento del tempo di permanenza dello ^{131}I sia l'efficacia terapeutica anche in assenza di organificazione dello ^{-}I stesso [28].

Tenuto conto di questi aspetti delle caratteristiche fisiologiche e della funzionalità del NIS, sono state attuate una serie di ricerche mirate all'individuazione di carcinomi, derivanti da diversi organi, che lo esprimessero naturalmente e che potessero, quindi, divenire target per eventuali terapie basate sullo Iodio radioattivo [29-38]. Dove l'espressione del NIS non fosse stata evidenziata in condizioni fisiologiche, alcuni gruppi si sono concentrati sulla messa a punto di tecniche di trasfezione e induzione

genica che possano consentire l'espressione e la funzionalità della proteina una volta posizionata in membrana (*gene therapy*) [39-42].

I risultati che propone la letteratura a riguardo sono, in molti casi, discordanti, in maniera particolare risultano non essere molto chiari i dati relativi all'espressione del NIS nei carcinomi mammari.

Scopo

Date le non esaustive informazioni ottenute dalla letteratura e l'indubbio interesse per una molecola che potrebbe risultare un ottimo target ai fini terapeutici per una delle neoplasie più diffuse al mondo, quale il carcinoma mammario, si è deciso di testare una serie di tecniche finalizzate all'individuazione del NIS in tessuti e colture cellulari derivanti da carcinomi mammari di vario tipo.

Campioni

Immunoistochimica

Basandosi sulle informazioni ottenute dalla letteratura [22-24], si è pensato a uno studio che comprendesse l'analisi immunologica per il NIS di una serie di tessuti derivanti da diversi istotipi di carcinoma mammario. Una volta individuato l'anticorpo più adatto agli esperimenti per la messa a punto della reazione, si è deciso di utilizzare, come tessuti controllo, campioni provenienti da tiroide, stomaco e ghiandole salivari.

I risultati ottenuti nelle reazioni di messa a punto del protocollo hanno convinto ad ampliare la casistica per ciascuno dei diversi tessuti analizzati:

Tiroide: 214 casi:

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
16: tessuto normale	19: ca. follicolare
84: nodulo iperplastico	40: ca. papillifero
12: iperplasia diffusa	4: ca. scarsamente differenziato
24: tiroidite linfocitaria	3: ca. indifferenziato
-	12: ca. midollare

Mucosa gastrica: 75 casi.

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Displasie</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
14: mucosa gastrica normale	7: mucosa gastrica displastica	6: ca. di tipi intestinale
19: gastrite cronica con iperplasia rigenerativa	-	9: ca. ad anello con castone
15: gastrite cronica con metaplasia intestinale	-	3: tumori neuroendocrini
-	-	2: GIST (GastroIntestinalStromalTumours)

Ghiandole salivari: 27 casi.

<i>Tessuto neoplastico</i>	<i>Tessuto non neoplastico</i>
10: ca. mucoepidermoide	Ghiandola sottomandibolare
3: tumore di Warthin	Ghiandola salivare minore
1: oncocitoma	Parotide
3: adenoma pleomorfo	-
3: ca. acinico	-
4: ca. adenoido-cistico	-
1: ca. mioepiteliale	-
2: ca. squamoso	-

Tessuto mammario

Durante gli interventi chirurgici a 32 pazienti con lesioni certe o sospette al seno, sono stati ottenuti **39 campioni** operatori “a fresco” (vedi tabella). Una parte di ciascun campione è stata fissata in formalina e inclusa in paraffina per le indagini di routine e per l’allestimento dei preparati per immunocistochimica.

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
4: lesione fibroepiteliale benigna	20: ca. duttali
6: parenchima ghiandolare normale	8: ca. lobulari
1: parenchima mammario con modificazioni lattazionali	-

Il campionamento in progetto ha riguardato, non solo, l’analisi di tessuti in paraffina ma anche l’allestimento di colture cellulari primarie derivanti da prelievi operatori a fresco.

Colture cellulari

La parte non fissata in formalina di ciascun campione è stata processata seguendo le procedure di allestimento di colture primarie da mammella (*vedi metodiche applicate*). Non tutte le colture cellulari, però, sono risultate idonee. A tal proposito, infatti, si sono verificate, durante il periodo di reclutamento e allestimento dei campioni, una serie di problematiche relative alla difficoltà di ottenere colture di cellule epiteliali e non di fibroblasti. Questi problemi, dovuti alla costituzione stessa del parenchima mammario (composto da parenchima ghiandolare fortemente frammisto a connettivo di sostegno e tessuto adiposo), sono stati risolti, dopo vari tentativi, grazie all’utilizzo di terreni selettivi per l’epitelio mammario umano (*vedi metodiche applicate*). L’utilizzo di questo mezzi di coltura ha consentito l’allestimento di colture cellulari primarie che, anche da conferma immunocistochimica con marcatori specifici (ck7, cK14), fossero prevalentemente/esclusivamente costituite da componente epiteliale.

Sono, così, state ottenute **17 colture cellulari vitali** (*vedi tabella seguente*) che sono state, prima di tutto, caratterizzate immunocistochimicamente, al fine di escludere una natura non epiteliale del campione. Accertata la natura delle cellule, le sospensioni sono state sottoposte ad estrazione dell’RNA.

Coltura	Diagnosi istologica del campione di origine
1T	Ca. duttale infiltrante
2T1	Ca. duttale infiltrante
2T2	Ca. duttale infiltrante
2N	Parenchima normale
3T	Ca. duttale infiltrante
3N	Parenchima normale
4T	Ca. duttale infiltrante
4N	Parenchima normale
5T	Ca. duttale infiltrante
5N	Parenchima normale
6T	ca. lobulare infiltrante
6N	Parenchima normale
7T	Ca. lobulare infiltrante
8T	Amartoma (<i>insorto in mammella con modificazioni lattazionali</i>)
9T	Ca. duttale infiltrante
9N	Parenchima normale
10	Ca. lobulare infiltrante

Metodiche applicate

Immunoistochimica

Per le indagini immunoistochimiche, è stato messo a punto un protocollo che comprendeva l'utilizzo di:

- ❑ Smascheramento con WCAP pH 8 a 95 °C.
- ❑ Anticorpo primario anti-hNIS (**Ab-1-Clone FP5A, NeoMarkers-LabVision Corporation, Fremont, Ca. Diluizione 1:200**).
- ❑ Sistema di amplificazione del segnale *Horse Radish Peroxidase polymer detection system (Ultravision LP, LabVision Corporation)*.

I campioni analizzati consistevano in fette di tessuto paraffinato di 2 µm di spessore.

I vetri sono stati:

- ❑ preriscaldati a 60°C per circa un'ora in stufa a secco
- ❑ incubati a 95°C in WCAP a pH 8 per 30'
- ❑ lasciati raffreddare e lavati in H₂O bidistillata
- ❑ incubati in H₂O₂ al 3% al fine di inibire le perossidasi endogene per 10'
- ❑ lavati in H₂O bidistillata e bagnati in tampone (PBS 1X + tween al 20%)
- ❑ incubati con soluzione Blocking per 20' a RT in camera umida
- ❑ incubati per 1h con anticorpo primario in camera umida
- ❑ 3 lavaggi successivi in tampone
- ❑ incubati con Enhancer Solution per 20' in camera umida
- ❑ 3 lavaggi successivi in tampone
- ❑ incubati con Polymer Solution per 30' in camera umida
- ❑ 3 lavaggi successivi in tampone
- ❑ incubati con DAB Solution (**Ultravision LP, LabVision Corporation**) per 3' in camera umida
- ❑ lavaggio con acqua di fonte
- ❑ contrasto in ematossilina di Meyer
- ❑ disidratazione in scala di alcoli
- ❑ montaggio

Per le reazioni di immunocitochimica con marcatori delle cellule epiteliali è stato seguito lo stesso protocollo, senza, unica differenza, lo smascheramento, non necessario nel caso di cellule in coltura.

Allestimento di colture cellulari

I pezzi operatori “freschi” di lesioni mammarie (in soluzione fisiologica o “a secco”) sono stati, nella maggior parte dei casi, prelevati direttamente dalla sala operatoria e portati al servizio di Anatomia Patologica dove il patologo ha provveduto al prelievo del campione di tessuto per la coltura cellulare. Questo prelievo va sempre eseguito nelle condizioni di sterilità maggiori possibili (***cappa sterile a flusso laminare, pinze, forbici e bisturi sterili***). A seconda della disponibilità del tessuto e, quindi, delle dimensioni del tumore asportato, il campione destinato alla coltura cellulare può essere più o meno consistente (sono sufficienti pochi mm³ di tessuto per l’allestimento di una coltura).

Il tessuto prelevato è stato, poi, riposto in contenitori sterili contenenti terreno di coltura addizionato con ***Penicillina-Streptomicina***. I campioni, così conservati, possono essere processati immediatamente, oppure, in alcuni casi, mantenuti a temperatura ambiente fino ad un massimo di 72 ore.

Il rischio di inquinamento microbico del campione, fino a questo momento, è molto alto soprattutto perché il tessuto, dall’asportazione chirurgica al contenitore sterile sotto cappa, può essere esposto a molti agenti inquinanti.

L’inquinamento microbico è sicuramente il principale, oltre che primo, rischio in cui si incorre nell’allestimento di una coltura cellulare primaria da tessuto fresco, superato i primi giorni di coltura, però, questo pericolo può considerarsi scongiurato, sempre che non sia l’operatore a commettere errori durante il processamento.

Come accennato in precedenza, però, nell’allestimento delle colture cellulari da tessuto mammario sono sopraggiunte altre problematiche. Si sono verificati, infatti, soprattutto all’inizio dello studio, una serie di problemi relativi all’invasione, nelle colture allestite, di popolazioni cellulari fibroblastiche che “soffocavano” le cellule dell’epitelio mammario impedendone la crescita e, quindi, falsando i possibili risultati.

Le problematiche di cui sopra sono state risolte grazie all'utilizzo di un terreno specifico per epitelio mammario umano (*MEBM, Mammary Epithelial Breast Media serum-free*

+ *Bovine Pituitary Extract + hEGF*

+ *Hydrocortisone + Insulin, Lonza, Milano*).

Estrazione di RNA e RT-PCR

Ogni coltura cellulare, una volta raggiunta la confluenza in fiasca e caratterizzata immunocitochimicamente, al fine di escludere l'eventuale crescita di fibroblasti, è stata tripsinizzata (*Tripsina-EDTA 1X, GIBCO, Invitrogen*) e "pellettata" (tramite centrifugazione). Il pellet così ottenuto è stato risospeso in circa 400 µl di RNA later (*RNA Stabilization Reagent, Qiagen*)

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule è stata eseguita con il *TRIZOL Reagent (Qiagen)* ed è stato purificato con il *QIAGEN Rneasy Mini Kit*, seguendo i protocolli forniti dal produttore.

L'amplificazione dei trascritti è stata effettuata tramite RT-PCR utilizzando i primers commerciali individuati in letteratura [21].

Risultati

Come già specificato nella sezione relativa al campionamento e alle metodiche utilizzate, l'analisi immunohistochimica con anticorpo anti-hNIS è stata eseguita su molti altri campioni, oltre a quelli mammari. Le motivazioni di questa scelta, che verranno, comunque, discusse nella sezione apposita di questo elaborato, sono state dettate dall'iniziale difficoltà riscontrata nell'ottenere reazioni positive in lesioni mammarie, nonostante la letteratura, in alcuni lavori, abbia mostrato il contrario [22-24].

Tessuto tiroideo (214 casi)

E' stata evidenziata immunoreattività di membrana nel 30% delle cellule follicolari normali [fig.4b], nel 90% delle cellule delle iperplasie diffuse [fig.5b], nel 60% delle cellule dei noduli iperplastici [fig.6b].

Nei tessuti neoplastici non è stata evidenziata immunoreattività [fig.7b] ad eccezione dei casi di carcinoma follicolare ben differenziato che hanno mostrato positività nel 40-60% delle cellule [fig.8b].

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
16: tessuto normale	19: ca. follicolare
84: nodulo iperplastico	40: ca. papillifero
12: iperplasia diffusa	4: ca. scarsamente differenziato
24: tiroidite linfocitaria	3: ca. indifferenziato
-	12: ca. midollare

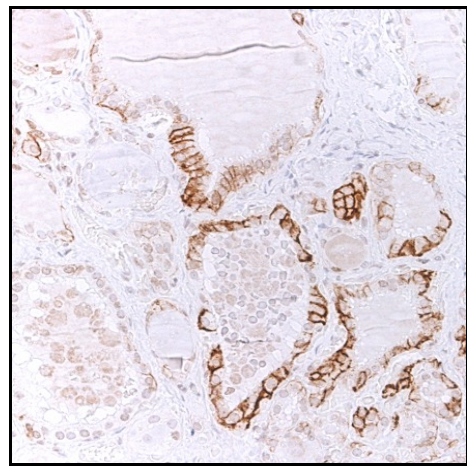
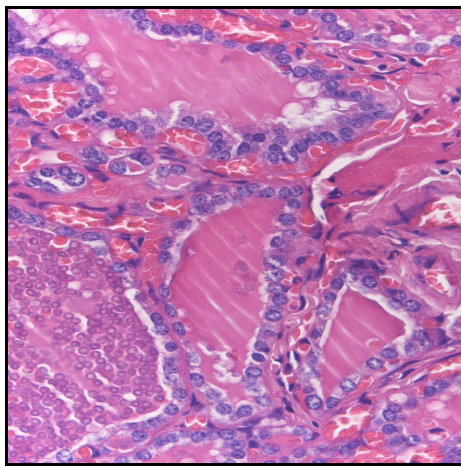


Fig.4a: tessuto tiroideo normale (colorazione EE)

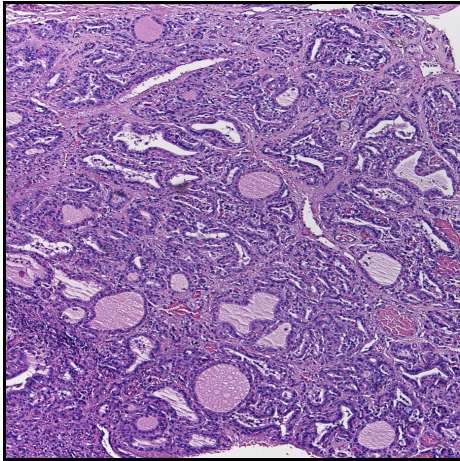


Fig.4b: tessuto tiroideo normale (anti-hNIS)

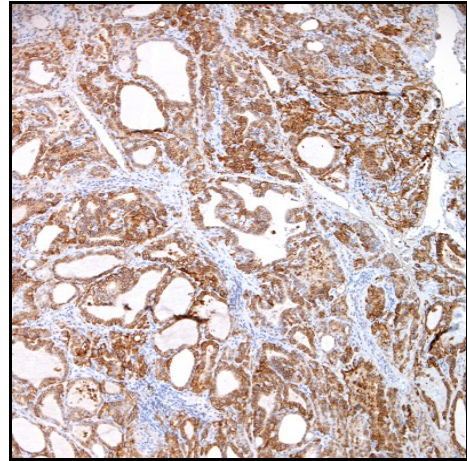


Fig.5a: malattia di Grave-iperplasia (colorazione EE) **Fig.5b:** malattia di Grave-iperplasia diffusa (anti-hNIS)

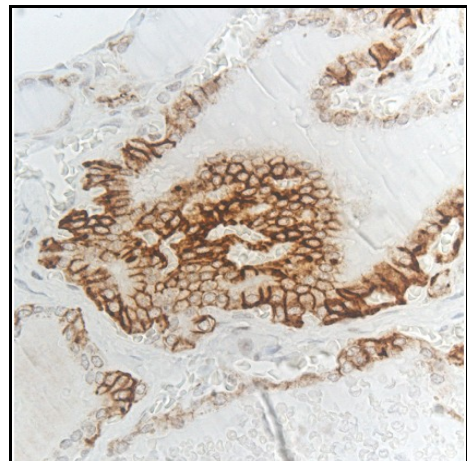
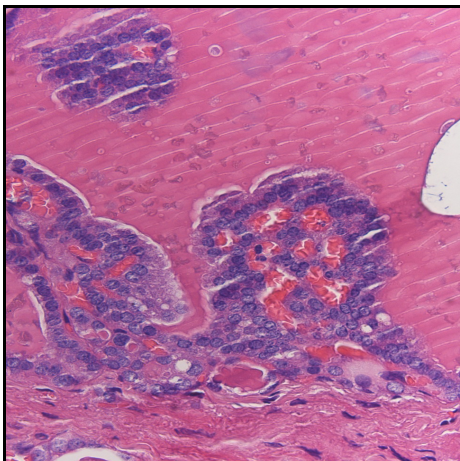


Fig.6a: nodulo iperplastico (colorazione EE)
Fig.6b: nodulo iperplastico (anti-hNIS)

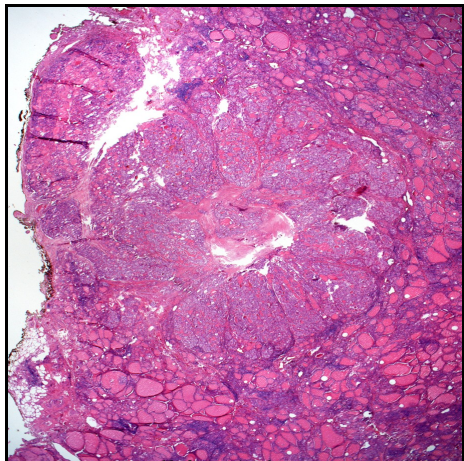


Fig.7a: ca. papillifero (colorazione EE)

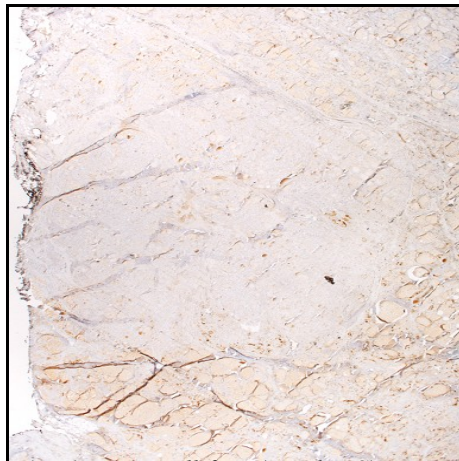


Fig.7b: ca. papillifero (anti-hNIS)

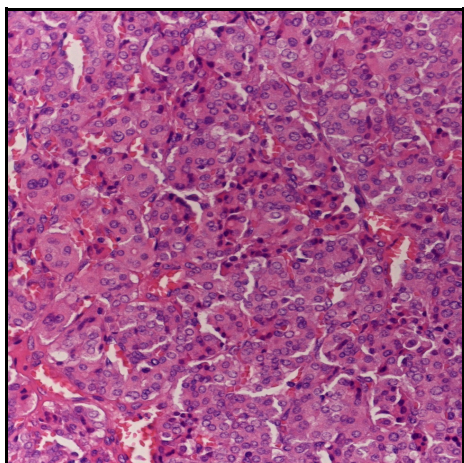


Fig.8a: ca.follicolare (colorazione EE)

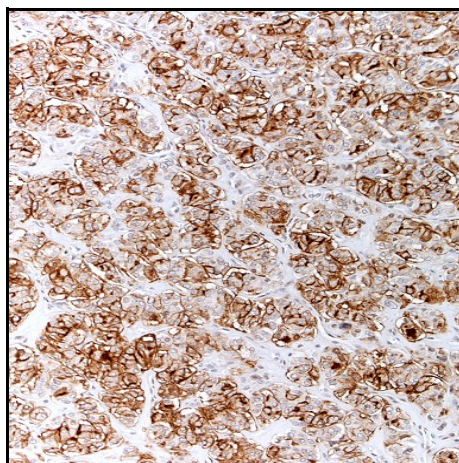


Fig.8b: ca.follicolare (anti-hNIS)

Mucosa gastrica (75 casi)

E' stata evidenziata immunoreattività di membrana nel 100% delle cellule normali delle foveole [fig.9]. Immunoreattività che scompare in maniera netta quando il tessuto assume aspetti metaplastici o displastici [fig.10].

Nei tessuti neoplastici non è stata evidenziata immunoreattività [fig.11] in nessuno degli istotipi presi in esame.

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Displasie</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
14: mucosa gastrica normale	7: mucosa gastrica displastica	6: ca. di tipi intestinale
19: gastrite cronica con iperplasia rigenerativa	-	9: ca. ad anello con castone
15: gastrite cronica con metaplasia intestinale	-	3: tumori neuroendocrini
-	-	2: GIST (GastroIntestinalStromalTumours)

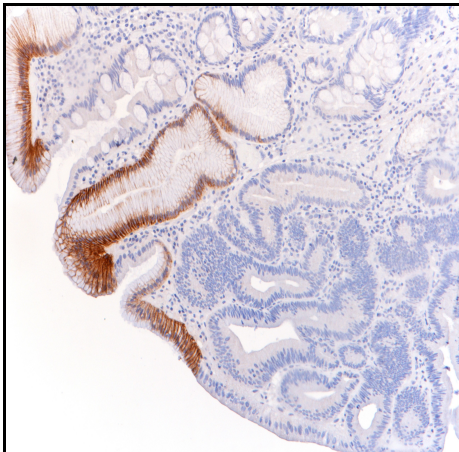


Fig.9: particolare di mucosa gastrica con aspetti metaplastici e neoplastici (anti-hNIS)

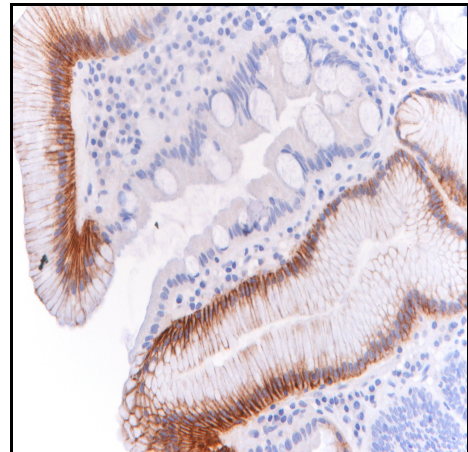


Fig.10: particolare a ad alto ingrandimento di area con metaplasia intestinale (anti-hNIS)

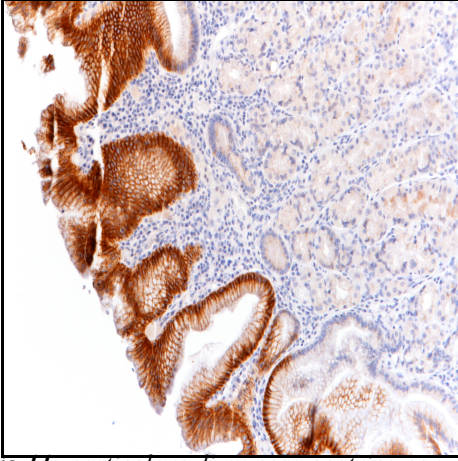


Fig.11: particolare di mucosa gastrica con iperplasia foveolare e aspetti neoplastici (anti-hNIS)

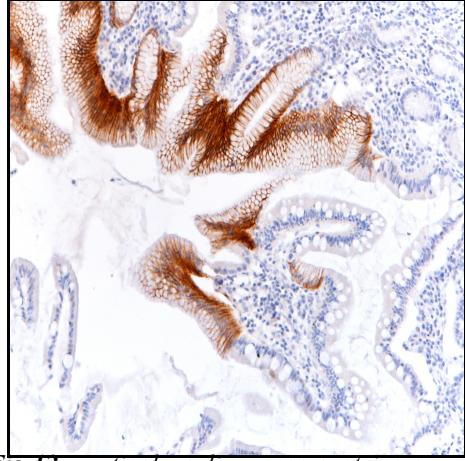


Fig.12: particolare di mucosa gastrica con aspetti iperplastici e metaplastici (anti-hNIS)

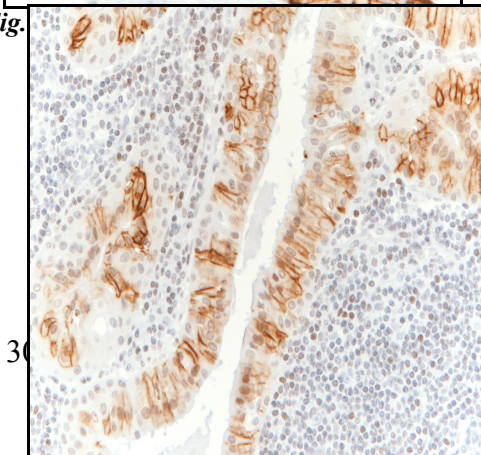
Ghiandole salivari (27 casi)

Anche in questo tessuto è stata evidenziata immunoreattività di membrana nel 100% delle cellule dei dotti parotidei [fig.13], nel 40-50% delle cellule dei dotti delle ghiandole salivari minori [fig.14] e nel 50-60% delle cellule delle neoplasie che presentano differenziazione analoga ai dotti striati, quali tumore di Warthin, oncocitoma e carcinoma mucoepidermoide [figg.15-18].

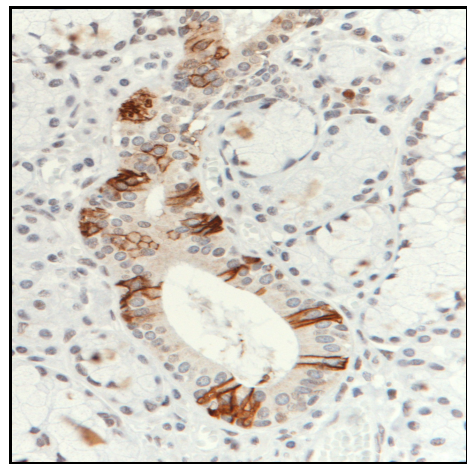
<i>Tessuto neoplastico</i>	<i>Tessuto non neoplastico</i>
10: ca. mucoepidermoide	Ghiandola sottomandibolare
3: tumore di Warthin	Ghiandola salivare minore
1: oncocitoma	Parotide
3: adenoma pleomorfo	-
3: ca. acinico	-
4: ca. adenoido-cistico	-
1: ca. mioepiteliale	-
2: ca. squamoso	-



Fig.



3



F

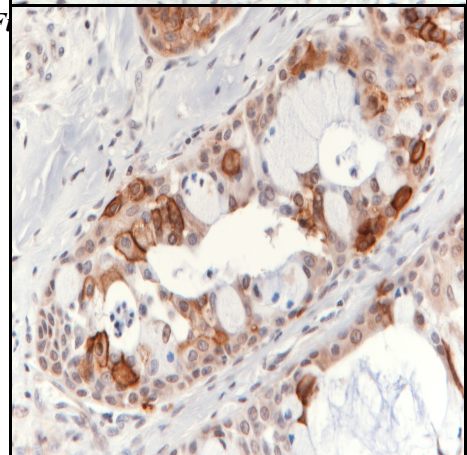


Fig.15: particolare di Tumore di **Fig.16:** particolare di ca.mucoepidermoide
hNIS) (anti-hNIS)

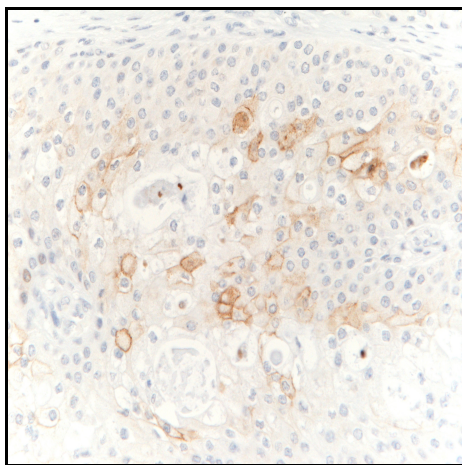


Fig.17: ca. mucoepidermoide (anti-hNIS)

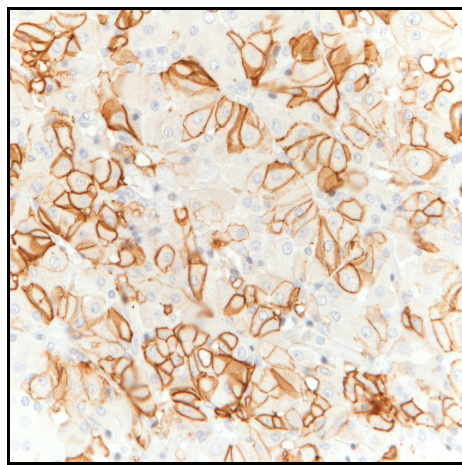


Fig.18: oncocitoma (anti-hNIS)

Tessuto mammario

Immunoistochimica: 39 campioni:

<i>Tessuto non neoplastico</i>	<i>Tessuto neoplastico</i>
4: lesioni fibroepiteliali benigne	20: ca. duttali infiltranti
6: parenchima ghiandolare normale	8: ca. lobulari infiltranti
1: parenchima mammario con modificazioni lattazionali	-

Nella quasi totalità dei casi l'immunoistochimica **non ha evidenziato la presenza della proteina NIS** né in membrana né a livello citoplasmatico.

E' stato tenuto, però, in considerazione il fatto che il tessuto mammario è un tessuto che richiede non poche attenzioni durante i vari processamenti, questo perchè l'ingente percentuale di tessuto adiposo ne rende, spesso, difficile la fissazione e, quindi, il taglio e l'allestimento di preparati. Di conseguenza, una volta certi delle buone condizioni dei preparati (dimostratisi adatti anche ad altre reazioni immunoistochimiche simili), è stata ripetuta l'indagine immunistochimica seguendo i protocolli descritti in letteratura, vale a dire, utilizzando la metodica di rivelazione **ABC (Avidina-Biotina Complex)**. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una **reazione aspecifica** legata, come si può vedere dalle *figg. 19, 20 e 21*, al metodo di rivelazione e non alla presenza o meno dell'anticorpo stesso.

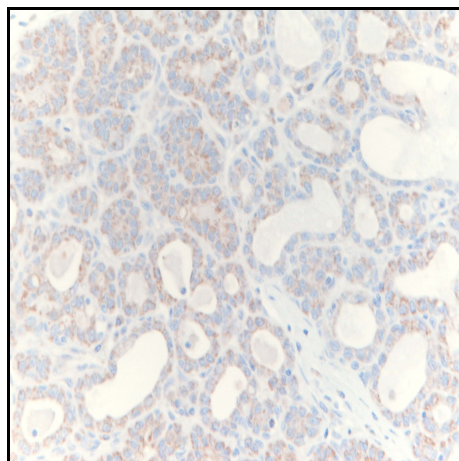
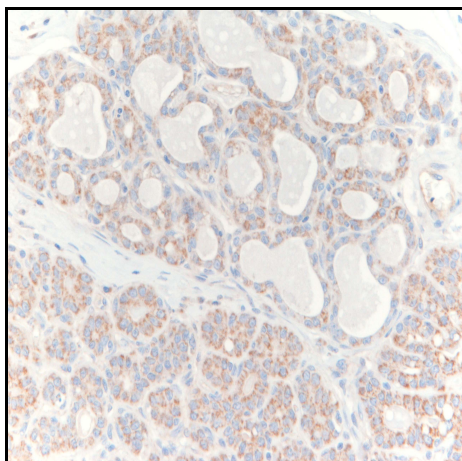


Fig.19: esempio di reazione **con** anti-hNIS, secondo il protocollo ABC. **Fig.20:** esempio di reazione **senza** anticorpo hNIS, secondo il protocollo ABC.

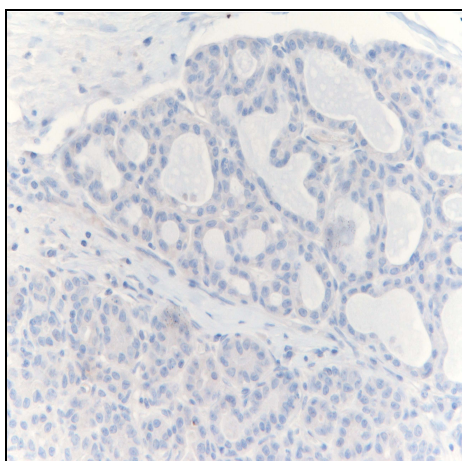


Fig. 21: esempio di reazione **con** anticorpo anti-hNIS secondo il protocollo HRP polymer.

Questo aspetto ha indotto ad aggiungere un controllo negativo, oltre al positivo sempre presente (tessuto tiroideo).

Solo 2 casi (corrispondenti ai campioni **7T** e **9T** della tabella a pag. 35) hanno mostrato una immunoreattività (anche se di difficile interpretazione) all'anticorpo anti-hNIS [figg.22,23].

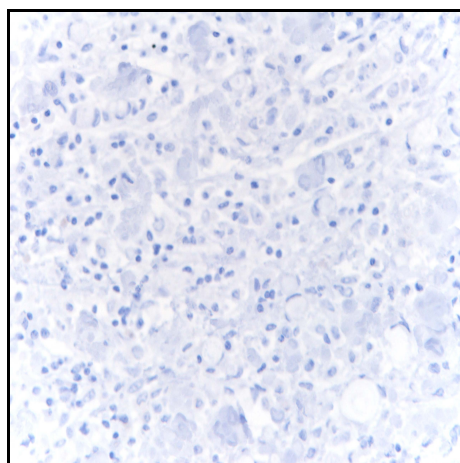
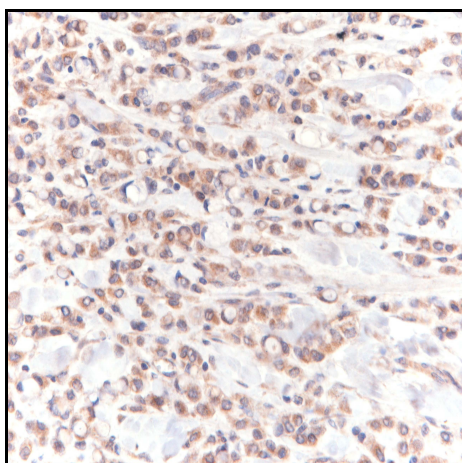


Fig.22: immunostochimica: particolari di tessuto del campione **7T**. Anticorpo anti-NIS (a sinistra); controllo negativo, senza anticorpo primario (a destra)

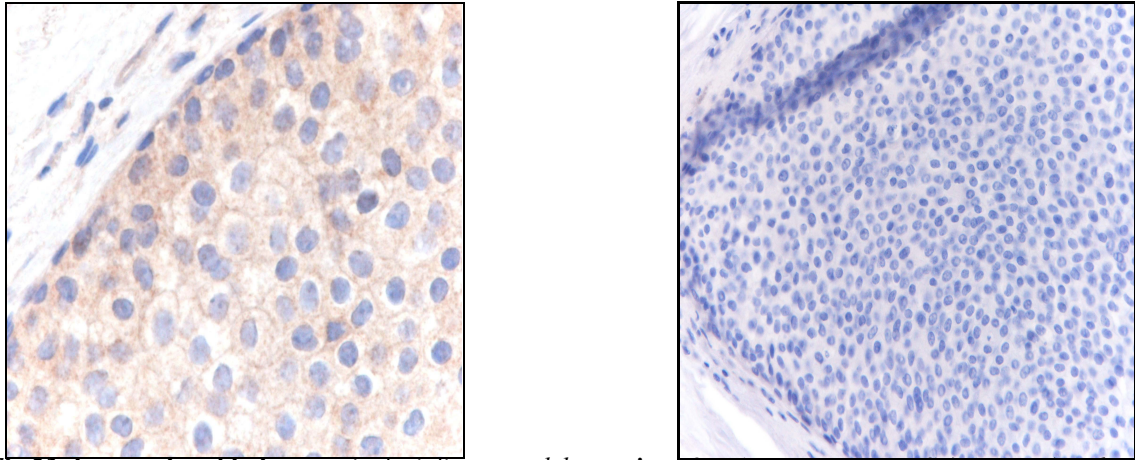


Fig.23: immunistochemica: particolari di tessuto del campione 91. Anticorpo anti-NIS (a sinistra); controllo negativo, senza anticorpo primario (a destra)

Colture cellulari: dati i risultati ottenuti sul paraffinato, si è deciso di utilizzare le **17 colture cellulari vitali** ottenute durante il reclutamento dei casi e provenienti da **10 pazienti: 7 ca. duttali infiltranti; 3 ca. lobulari infiltranti, 1 lesione benigna (amartoma) insorta in una mammella in lattazione e 6 tessuti normali**, previa caratterizzazione immunocitochimica, con marcatori specifici, per la conferma della loro natura epiteliale.

Caratterizzazione immunocitochimica

Come accennato in precedenza, a seguito delle difficoltà incontrate nell'allestimento di colture cellulari che fossero certamente composte da cellule epiteliali, si sono resi necessari alcuni accorgimenti nell'allestimento delle colture cellulari, come l'utilizzo di terreni specifici e la caratterizzazione immunocitochimica delle cellule con marcatori specifici (cK7, cK14) [figg.24,25].

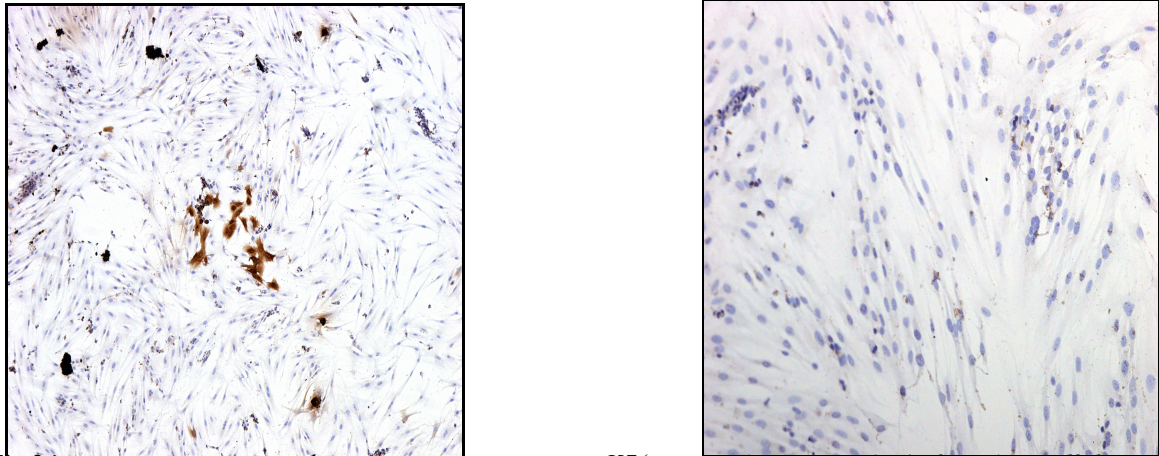


Fig.24: reazione immunocitochimica con anticorpo anti-cK7(a sinistra) e anti cK-14 (a destra) su cellule cresciute **in assenza** di terreno specifici per l'epitelio mammario

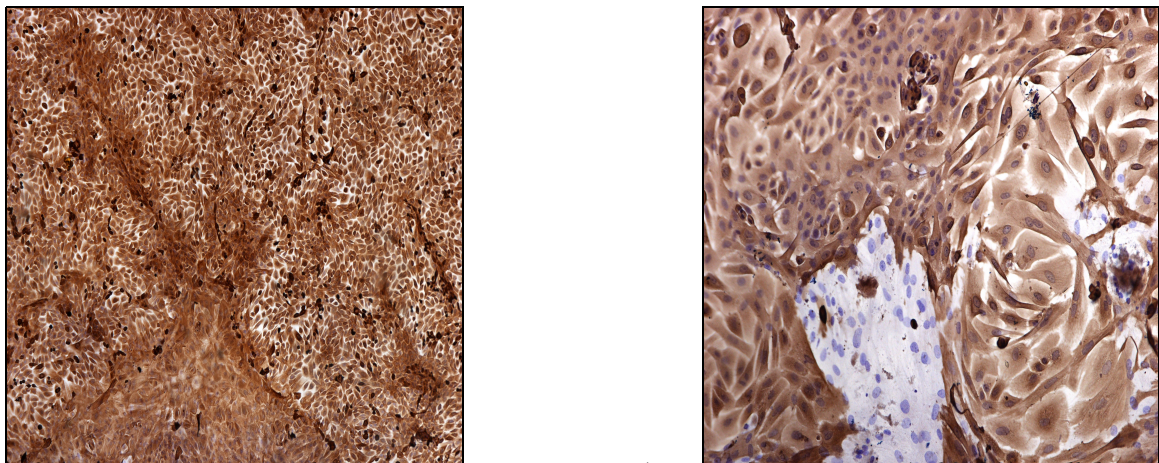


Fig.25: reazione immunocitochimica con anticorpo anti-cK7(a sinistra) e anti cK-14 (a destra) su cellule cresciute **in presenza** di terreno specifici per l'epitelio mammario

Accertata la natura epiteliale delle cellule in nostro possesso e preso atto che le indagini immunocistochemiche con anticorpo anti-hNIS su tessuto paraffinato hanno dato risultato negativo nella quasi totalità, si è deciso di intraprendere la ricerca della proteina (tramite *immunocistochemica*) e del suo trascritto sulle cellule in coltura a nostra disposizione.

<i>Coltura</i>	<i>diagnosi istologica del campione di origine</i>	<i>NIS (mRNA)</i>	<i>NIS in ich su colture</i>
1T	Ca. duttale infiltrante	-	-
2T1	Ca. duttale infiltrante	-	-
2T2	Ca. duttale infiltrante	-	-
2N	Parenchima normale	-	-
3T	Ca. duttale infiltrante	-	-
3N	Parenchima normale	-	-
4T	Ca. duttale in situ	-	-
4N	Parenchima normale	-	-
5T	Ca. duttale infiltrante	-	-
5N	Parenchima normale	-	-
6T	ca. lobulare infiltrante	-	-
6N	Parenchima normale	-	-
7T	Ca. lobulare infiltrante	+	+
8T	Amartoma (<i>insorto in mammella con modificazioni lattazionali</i>)	-	-
9T	Ca. duttale infiltrante	+	-
9N	Parenchima normale	-	-
10	Ca. lobulare infiltrante	-	-

Nella tabella sono sintetizzati i risultati della ricerca del mRNA nelle colture cellulari messi a confronto con le indagini immunocistochemiche con anticorpo anti-hNIS sulle stesse.

Le uniche cellule che hanno mostrato una, seppur scarsa, immunoreattività sono risultate essere quelle appartenenti alla coltura derivante dal campione **7T** [fig.26].

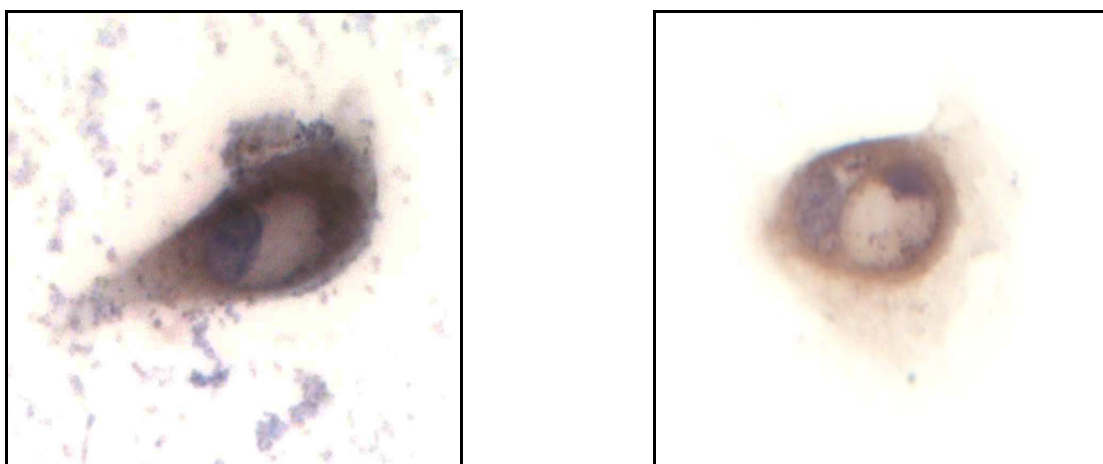


Fig.26: immunocitochimica: immagini (ad alto ingrandimento) di cellule del **campione 71** positive all'anticorpo anti h-NIS.

L'analisi dei risultati ha messo in evidenza che:

- **analisi immunoistochimiche ed immunocitochimiche** con anticorpo anti-NIS su tessuto mammario, di origine neoplastica e non, hanno dato, nella quasi totalità dei casi, **esito negativo**.
- **estrazione ed amplificazione dell'mRNA del gene NIS** ha **confermato l'assenza** del trascritto nella quasi totalità dei casi analizzati.
- con l'eccezione di un caso (9T), vi è **correlazione fra risultati immunochimici e molecolari**.

Discussione

Come già ampiamente specificato nell'introduzione di questo elaborato, il NIS è una molecola fondamentale nel trasporto passivo dello Iodio attraverso le membrane plasmatiche e questo lo rende un ottimo target per terapie mirate con Iodio radioattivo, terapie già utilizzate, con ottimi risultati, in molte patologie tiroidee.

Quelle che possono essere le potenzialità di questa molecola ai fini terapeutici sono evidenti, e, da questo punto di vista, sono state pubblicate ricerche che mostrano come, anche in tessuti che non esprimono il NIS in maniera fisiologica, l'induzione della sua espressione (tramite farmaci o trasfezioni virali) può consentire una ritenzione delle molecole di Iodio radioattivo all'interno delle cellule per il tempo necessario alla riuscita dell'effetto terapeutico [39-41].

La ghiandola mammaria sembra essere uno dei tessuti in cui il NIS risulta essere espresso durante il periodo della lattazione. Probabilmente, questo aspetto può essere dovuto alla necessità, da parte dell'organismo materno, di arricchire il latte con Iodio per consentire lo sviluppo completo del neonato [21, 29].

Altri lavori hanno, comunque, dimostrato l'esistenza del NIS anche in neoplasie di origine mammaria [23, 24, 29, 30], aprendo la strada e l'interesse per una possibile "target therapy" con ¹³¹I anche nelle lesioni mammarie.

E' stato partendo da queste informazioni che si è pensato di andare alla ricerca di tumori mammari che esprimessero in maniera certa e rilevabile questa molecola di membrana. Da questo punto di vista, l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Bologna presso l'Ospedale Bellaria è risultato essere un ottimale centro di raccolta di lesioni di questo tipo, grazie all'enorme bacino di utenza che raccoglie la gran parte delle patologie tumorali mammarie presso l'Unità Operativa di Chirurgia Oncologica. Questo ci ha concesso di avere la possibilità di raccogliere molto materiale, la gran parte del quale è stato, comunque, destinato alla parte diagnostica.

Come accennato in precedenza, si sono riscontrati non pochi problemi in una delle fasi cruciali del progetto: è risultata, infatti, estremamente complicata la messa a punto di un protocollo per l'allestimento delle colture primarie da tessuto mammario. Il parenchima mammario è, infatti, composto da una stretta commistione di tessuti (ghiandolare/epiteliale, adiposo e connettivo di sostegno). Questa struttura porta, in fase

di coltura, ad una selezione che premia le cellule del connettivo (fibroblasti), impedendo la crescita delle epiteliali (popolazione che rappresenta la ghiandola e, in caso di neoplasia, il tumore stesso).

Una coltura primaria che rappresenti il tumore deve necessariamente essere composta, almeno per la maggior parte, da cellule di origine tumorale e, quindi, in questo specifico caso, epiteliale.

I tentativi di cui si è accennato nella sezione relativa al reclutamento dei campioni sono stati vari:

- si è, inizialmente, cercato di selezionare i campioni più adatti alla crescita in coltura partendo dall'età delle pazienti, basandosi, cioè, sull'ipotesi che una ghiandola trofica dovesse essere più “forte” anche nella crescita in coltura. I risultati ottenuti non hanno, però, confermato questa ipotesi;
- in un secondo tempo si è provato a selezionare le cellule epiteliali in maniera “fisica”, vale a dire utilizzando “microbeads” magnetiche che fossero legate ad anticorpi specifici per la membrana delle cellule epiteliali, in maniera tale che, eluendo, poi, la sospensione in stretta prossimità di una piastra magnetica, si potessero “raccolgere” e concentrare solo le cellule che avessero inglobato le “beads” e non tutte le altre presenti nella sospensione. Anche questo tentativo non ha, però, dato risultati positivi dando origine a sospensioni di cellule non vitali.
- come ultimo tentativo, è stato cercato un terreno che potesse essere il più adatto possibile per la crescita di queste cellule, ma che, soprattutto, impedisse il proliferare delle cellule del connettivo, causa principale della perdita della componente epiteliale in coltura. Questo tentativo, come già accennato in precedenza, ha dato ottimi risultati [*vedi figg.24,25*].

Per quanto ha, invece, riguardato la parte relativa all'immunoistochimica su tessuto paraffinato, si sono sicuramente avuti meno problemi, anche se, i tessuti mammari non hanno evidenziato immunoreattività sin dall'inizio dello studio. La discordanza di questo fatto con i dati che mostrava la letteratura ci ha spinto a cercare la metodica ed, eventualmente, anche l'anticorpo, più adatti a questo tipo di tessuto, visto e considerato

che, per quanto riguardava gli altri tessuti studiati, non si erano verificati problemi di alcun tipo. I risultati delle varie prove sono esemplificati dalle figg. 19, 20 e 21.

Tenuto conto di questi risultati, delle reazioni immunoistochimiche sugli altri tessuti e del fatto che sono stati testati tutti i parametri modificabili nei protocolli, si è ottenuto, da un lato, la conferma della negatività dei risultati in tessuto mammario e, dall'altro, la conferma del rischio di avere falsi positivi nelle reazioni in cui sono stati utilizzati sistemi di rivelazione diversi.

In considerazione di questi aspetti, la ricerca si è anche diretta verso il messaggero nelle cellule raccolte, questo perchè è sempre valido l'assunto che l'assenza (o la non rilevabilità) di una proteina non necessariamente sta a significare anche l'assenza del messaggero codificante per essa ma i dati ottenuti dall'estrazione dell'RNA e dalla sua amplificazione hanno confermato i risultati dell'immunoistochimica.

Il NIS rimane, comunque, una molecola che potrebbe assumere importanza rilevante nell'applicazione delle terapie a base di Iodio radioattivo, questo, però, solo nei casi in cui la sua presenza e sua funzionalità siano costitutive o in quelle situazioni in cui, a seguito di terapia genica efficace, ne si riesca ad indurre la sintesi e la funzionalità.

Bibliografia

1. **Damiani S & Eusebi V:** *Gross and microscopic pathology*. In: Donegan WL, Spratt JS eds. *Cancer of the breast*. Philadelphia: Saunders, 2002: 347-375.
2. **Tavassoli F.A. and Devilee P.** WHO. *Tumours of the breast and female genital organs*. 3rd (5th). 2003. IARC Press, Lyon. WHO classification of tumours. Kleihues P. And Sobin L
3. **Lakhani SR, Gusterson BA et al.** *The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2*. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar;6(3):782-9.
4. **Tot T, Tabar L, Dean PB.** *The pressing need for better histologic–mammographic correlation of the many variations in normal breast anatomy*. *Virchows Arch*. 2000; 437: 338-344.
5. **Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C et al.** *Efficacy of MRI and mammography for breast cancer screening in women with familial or genetic predisposition*. *N Engl J Med*. 2004; 351: 427-437.
6. **AJCC.** *Cancer staging manual*. 6. New York, Springer, 2002.
7. **Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew NM et al:** *America joint committee on cancer prognostic factors consensus conferences*. *Cancer*, 2000; 88: 1739-1757.
8. **Seshadri R, Matthews C, Dobrovic A et al.** *The significance of oncogene amplification in primary breast cancer*. *Int J Cancer*. 1989 Feb 15;43(2):270-2.
9. **Shepard HM, Lewis GD et al.** *Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic*. *J Clin Immunol*. 1991 May;11(3): 117-27.
10. **Press MF, Bernstein L, Thomas PA et al.** *HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas*. *J Clin Oncol*, 1997, 15: 2894-2904.
11. **Paik S, Byant J, Tan-Chiu E et al.** *HER2 and Choice of Adjuvant Chemotherapy for Invasive Breast Cancer: National Surgical Adjuvant Breast*

- and Bowel Project Protocol B-15*. Journal of the National Cancer Institute, 2000, Vol. 92, No. 24, December 20.
12. **Sassen A, Rochon J, Wild PJ et al.** *Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3, AND HER4 in 278 breast cancer patients*. Breast Cancer Res. 2008 Jan 8;10(1).
 13. **Carrasco N.** *Iodide transport in the thyroid gland*. Biochim Biophys Acta, 1993. 1154: 65-82.
 14. **Dai G, Levy O, Carrasco N.** *Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter*. Nature, 1996; 379: 458-460.
 15. **Spitzweg C, Heufelder AE.** *The sodium iodide symporter: its emerging relevance to clinical thyroidology*. Eur J Endocrinol, 1998, 138: 374-375.
 16. **Spitzweg C and Morris J.** *The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications*. Clin Endocrinol. 2002 Nov;57(5):559-74.
 17. **Dohàn O, De La Vieja A, Paroder V et al.** *The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance*. Endocr Rev, 2003, Feb; 24(1): 48-77.
 18. **De La Vieja A, Dohàn O, Levy O, Carrasco N.** *Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology*. Physiol Rev. 2000, Jul; 80(3): 1083-105.
 19. **Smanik P. A, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL and Jhiang SM.** *Cloning of the Human Sodium Iodide Symporter*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996, 226(2), 339-345.
 20. **Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G and Pourcher T.** *Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues*. Journal of Endocrinology , 2001, 170, 185–196.
 21. **Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, and Heufelder AE,** *Analysis of Human Sodium Iodide Symporter Gene Expression in Extrathyroidal Tissues and Cloning of Its Complementary Deoxyribonucleic Acids from Salivary Gland, Mammary Gland, and Gastric Mucosa*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998;83(5):1746-51.

22. **Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY et al.** *An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues.* Endocrinology, 1998 Oct;139(10):4416-9.
23. **Vayre L, Sabourin JC, Caillou B et al.** *Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues.* European Journal of Endocrinology, 1999;141, 382–386.
24. **Wapnir IL, Van De Rijn M, Nowels K et al.** *Immunohistochemical Profile of the Sodium/Iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003, 88(4):1880–1888.
25. **Kotani T, Ogata Y, Yamamoto I et al.** *Characterization of gastric Na⁺/I⁻ symporter of the rat.* Clin. Immunol Immunopathol, 1998, 89: 271-278.
26. **Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M et al.** *Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene.* Clin Endocrinol, 1998, 49: 517-523.
27. **Foley KP, Leonard MW and Engel JD.** *Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction.* Trends Genet, 1993, 9: 380-385.
28. **Spitzweg C, O'Connor M, Bergert E, Castro M, Tindall D, Young C, Morris J.** *Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter.* Cancer Res. 2000, 60:6526–6530
29. **Tazebay U, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier L, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell R, Carrasco N,** *The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer.* Nat Med. 2000, 6:871–878
30. **Eskin B, Parker J, Bassett J, George D** *Human breast uptake of radioactive iodine.* Obstet Gynecol. 1974, 44:398–402
31. **Kim E, Pjura G, Gobuty A, Verani R** *¹³¹I uptake in a benign serous cystadenoma of the ovary.* Eur J Nucl Med. 1984, 9:433–445
32. **Jackson G, Graham WP, Flickinger F, Kennedy T** *Thymus accumulation of radioactive iodine.* PA Med. 1979, 82:37–38

33. **Lejeune M, Heron C, Tenenbaum F, Sarfati PO, Louvel A, Lutton JP, Richard B** *Iodine ¹³¹ uptake by a bronchogenic cyst in a patient with differentiated carcinoma of the thyroid gland.* Presse Med. 2000, 29:1345–1347
34. **Wu S, Kollin J, Coodley E, Lockyer T, Lyons K, Moran E, Parker L, Yu A** *I¹³¹ total-body scan: localization of disseminated gastric adenocarcinoma. Case report and survey of the literature.* J Nucl Med. 1984, 1204–1209
35. **Misaki T, Takeuchi R, Miyamoto S, Kasagi K, Matsui Y, Konishi J** *Radioiodine uptake by squamous-cell carcinoma of the lung.* J Nucl Med. 1994, 35:474–475
36. **Fernandez-Ulloa M, Maxon H, Mehta S, Sholiton L** *Iodine¹³¹ uptake by primary lung adenocarcinoma. Misinterpretation of ¹³¹I scan.* JAMA. 1976, 236: 857–858
37. **Acosta J, Chitkara R, Khan F, Azueta V, Silver L** *Radioactive iodine uptake by a large cell undifferentiated bronchogenic carcinoma.* Clin Nucl Med. 1982, 7:368–369
38. **Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE** *Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands.* J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84:4178–4184
39. **Spitzweg C, Zhang S, Bergert E, Castro M, McIver B, Heufelder A, Tindall D, Young C, Morris J** *Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines.* Cancer Res. 1999, 59:2135–2141
40. **Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart J, Yeh P, Filetti S, Schlumberger M, Perricaudet M** *Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy.* Cancer Res. 2000, 60:3484–3492
41. **Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC** *In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer.* Gene Ther. 2001, 8:1524–1531
42. **Cho JY, Shen DH, Yang W, Williams B, Buckwalter TL, La Perle KM, Hinkle G, Pozderac R, Kloos R, Nagaraja HN, Barth RF, Jhiang SM** *In vivo imaging and radioiodine therapy following sodium iodide symporter gene*

transfer in animal model of intracerebral gliomas. Gene Ther. 2002, 9:1139–1145