

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Morfofisiologia e Patologia Veterinaria con Applicazioni
Biotechnologiche**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET/03

**Ruolo dei recettori tirosinchinasici
in oncologia animale**

Presentata da

Dott.ssa Silvia Sabattini

Coordinatore Dottorato

Prof. Eraldo Seren

Relatore

Prof. Giuliano Bettini

Esame finale anno 2012

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1. Biologia dei recettori tirosinchinasici	
1.1 Introduzione	3
1.2 Struttura e attivazione dei recettori tirosinchinasici.....	4
Bibliografia	11
Capitolo 2. Ruolo dei recettori tirosinchinasici nell'oncogenesi e nella progressione neoplastica	
2.1 Meccanismi di disregolazione.....	13
2.2 Metodi di valutazione.....	16
2.3 Terapie a bersaglio molecolare.....	20
Bibliografia	25
Capitolo 3. I recettori tirosinchinasici in oncologia veterinaria	
3.1 Recettori del fattore di crescita epidermico.....	29
3.2 Recettori dell'insulina.....	36
3.3 Recettori del fattore di crescita di derivazione piastrinica	37
3.4 Recettori del fattore di crescita dell'endotelio dei vasi	44
3.5 <i>Met</i>	45
3.6 Gli inibitori tirosinchinasici in medicina veterinaria	46
Bibliografia	53
Capitolo 4. Fattori istologici e immunoistochimici di prognosi nel mastocitoma cutaneo felino	
4.1 Introduzione	65
4.2 Materiali e Metodi	67
4.3 Risultati	72
4.4 Discussione	78
4.5 Conclusioni	83
Bibliografia	85
Capitolo 5. Significato prognostico delle disregolazioni di <i>Kit</i> nel mastocitoma cutaneo felino	
5.1 Introduzione.....	91
5.2 Materiali e Metodi.....	94
5.3 Risultati.....	100

5.4	Discussione.....	106
5.5	Conclusioni	113
	Bibliografia	115
Capitolo 6. Ruolo prognostico dell'espressione di EGFR nel carcinoma squamocellulare del gatto		
6.1	Introduzione.....	121
6.2	Materiali e Metodi.....	124
6.3	Risultati.....	127
6.4	Discussione.....	133
6.5	Conclusioni	135
	Bibliografia	137
Capitolo 7. EGFR e cancerogenesi da inquinamento atmosferico nei tumori polmonari primitivi del cane		
7.1	Introduzione.....	141
7.2	Materiali e Metodi.....	142
7.3	Risultati.....	145
7.4	Discussione.....	155
7.5	Conclusioni	158
	Bibliografia	159

Introduzione

L'avvento della biologia molecolare in oncologia ha svelato la presenza di un'enorme variabilità genetica delle neoplasie e ha permesso di dimostrare come tumori appartenenti al medesimo tipo istologico possano essere ulteriormente sottoclassificati in gruppi a diverso comportamento biologico sulla base dei profili di espressione proteica.

I progressi sostanziali in campo genetico hanno permesso l'identificazione di alterazioni riguardanti le vie intracellulari di trasduzione del segnale, e quindi delle proteine coinvolte nella regolazione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare. Tali alterazioni interessano spesso la classe di proteine recettoriali ad attività tirosinchinasica.

Disregolazioni dei recettori tirosinchinasici (RTK) sono di frequente riscontrate nei tumori dell'uomo e in molti casi sono indicatori biologici che permettono di definire in maniera più accurata la prognosi dei pazienti. Possono rappresentare inoltre marker predittivi per la risposta a terapie antitumorali con farmaci a bersaglio molecolare. Numerosi inibitori tirosinchinasici (TKI) sono attualmente in corso di studio o già disponibili per l'utilizzo in oncologia umana, e molti di questi hanno dimostrato una significativa efficacia utilizzati singolarmente o in combinazione a terapie convenzionali.

Studi recenti indicano che un quadro analogo di disregolazione dei recettori tirosinchinasici è presente anche nelle neoplasie dei piccoli animali, e ne suggeriscono in molti casi un'implicazione prognostica. Gli inibitori tirosinchinasi sono solo da poco entrati nell'arena dell'oncologia veterinaria, ma i risultati ottenuti dall'impiego di molecole come toceranib e masitinib lasciano supporre che i TKI siano destinati a essere integrati definitivamente nei protocolli terapeutici standard.

Resta tuttavia ancora parecchio lavoro da fare, tra cui la caratterizzazione delle principali disregolazioni dei RTK che intervengono nelle neoplasie animali e la valutazione del loro ruolo prognostico. Occorre inoltre definire i campi di applicazione delle diverse molecole di TKI mediante valutazione dell'attività biologica in vitro e in vivo, impostare regimi che ne diminuiscano la tossicità e valutarne l'efficacia in combinazione con i protocolli radioterapici e chemioterapici attualmente impiegati.

Biologia dei recettori tirosinchinasici

1.1 Introduzione

Le chinasi sono proteine enzimatiche che giocano un ruolo essenziale nella trasduzione dei segnali responsabili di crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare [Alberts *et al.*, 2009]. Agiscono mediante *autofosforilazione*: legano cioè ATP e lo utilizzano per aggiungere gruppi fosfato a residui specifici della proteina stessa, generando segnali a cascata all'interno della cellula. In gran parte dei casi, la fosforilazione delle chinasi è innescata da un segnale extracellulare, ad esempio il legame con un fattore di crescita [Hubbard e Till, 2000].

Le chinasi possono essere localizzate sulla superficie cellulare, nel citoplasma o a livello nucleare e sono generalmente suddivise in due categorie principali: le *tirosinchinasi*, che fosforilano proteine a residui di tirosina, e le *serina/treonina-chinasi*, che fosforilano su serine e/o treonine. Alcune chinasi sono in grado di svolgere entrambe le funzioni e sono pertanto dette *chinasi a doppia funzione* [London, 2004].

Si stima che esistano approssimativamente 518 chinasi codificate dal genoma umano, 90 delle quali sono tirosinchinasi. Cinquantotto delle 90 tirosinchinasi conosciute sono glicoproteine recettoriali ancorate a livello di membrana plasmatica (*recettori tirosinchinasici*, RTK) [Robinson *et al.*, 2000]. A questa categoria appartengono i recettori per i principali fattori di crescita, (es. EGF, IGF, NGF, PDGF, SCF, M-CSF, FGF, VEGF), per alcune citochine (es. interleuchine, interferone, TNF) e per ormoni peptidici (es. insulina, somatotropina) [London, 2004; Alberts *et al.*, 2009]. I recettori tirosinchinasici sono classificati in venti famiglie strutturali [Robinson *et al.*, 2000], ciascuna destinata alla sua famiglia complementare di ligandi proteici. Le principali classi di RTK sono illustrate schematicamente nella **Figura 1.1**.

Questi recettori captano i ligandi mediante i loro domini extracellu-

lari e, a legame avvenuto, reclutano e attivano enzimi intracellulari, che a loro volta inoltrano i segnali all'interno della cellula secondo le istruzioni del recettore [Alberts *et al.*, 2009]. Tipicamente i RTK danno origine a cascate di segnali destinati al nucleo; in tal modo intervengono sui profili di espressione genica, con effetti duraturi sul metabolismo, la crescita, il differenziamento e la morte cellulare [Müller-Esterl, 2007]. Per tali motivi mutazioni nei geni dei RTK e dei loro subordinati “a valle” possono disaccoppiare queste vie di segnalazione dal controllo degli stimoli esterni, avviando il dedifferenziamento delle cellule interessate e determinando in ultimo una proliferazione cellulare incontrollata [Müller-Esterl, 2007].

L'analisi funzionale di queste proteine e l'indagine strutturale dei rispettivi geni hanno grandemente contribuito in medicina umana alla comprensione delle vie intracellulari di trasduzione del segnale e hanno segnato i primi passi sulla strada di una diagnostica avanzata e di una terapia “razionale” delle malattie tumorali, che si reggono sulla conoscenza particolareggiata delle dinamiche molecolari coinvolte nella cancerogenesi [Zwick, 2001].

1.2 Struttura e attivazione dei recettori tirosinchinasici

Gli RTK condividono la medesima struttura di base e sono composti da diversi domini funzionali (**Figura 1.1**).

- *Dominio extracellulare* – Comprende il sito di *binding N-terminale* per il ligando. Presenta diverse combinazioni di motivi strutturali e rappresenta la porzione più variabile del recettore. Sulla base delle analogie strutturali degli elementi che compongono il dominio extracellulare i RTK sono raggruppati nelle diverse famiglie.
- *Dominio transmembrana* – È costituito da una singola *alfa elica* di 25 aminoacidi idrofobici che attraversano il doppio strato lipidico e funge da connessione tra il dominio extracellulare e quelli intracellulari.
- *Dominio juxtamembrana* – Comprende una cinquantina di aminoacidi, separa il dominio transmembrana da quello catalitico ed è sede di importanti funzioni di regolazione. È una regione ben conservata tra recettori appartenenti alla stessa famiglia ed è coinvolta nella modulazione della trasduzione del segnale da parte di segnali extrarecettoriali.
- *Dominio catalitico o tirosinchinasico* – Responsabile dell'attività enzimatica, è formato da 250 aminoacidi e ha un'elevata omologia fra tutti i RTK. PDGFR, *Kit* e VEGFR si differenziano in quanto il dominio catalitico è discontinuo, poiché interrotto da un inserto di circa 100 aminoacidi.
- *Regione carbossiterminale* – Ha lunghezza e funzioni variabili e rappresenta il

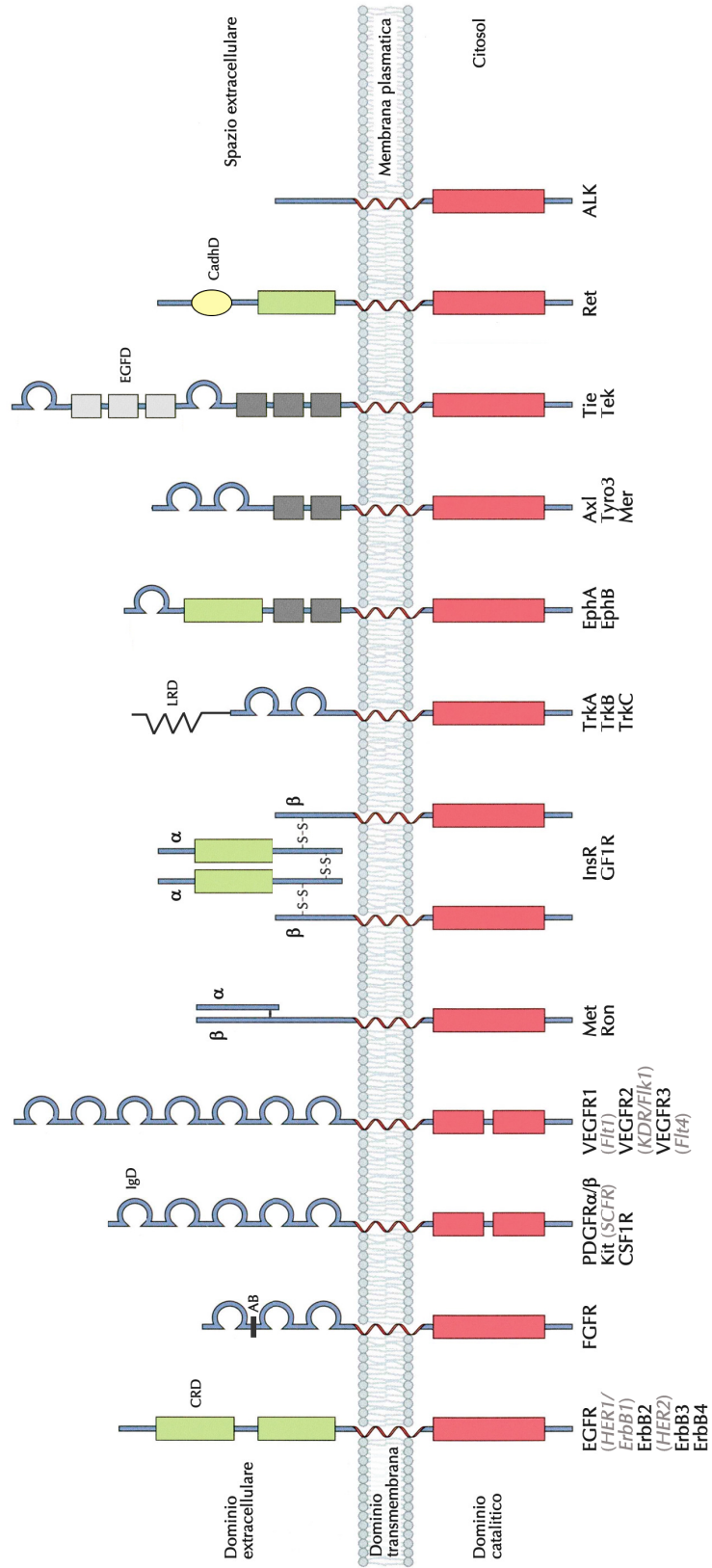


Figura 1.1 Principali famiglie di recettori tirosinchinasici (modificato da Alberts et al., 2009).

FGFR	Recettori del fattore di crescita dei fibroblasti FGFR1 (flg) FGFR2 (bek) FGFR3 FGFR4	Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)	Proliferazione di cellule stromali e periciti; modulatori dello sviluppo embrionale del mesoderma; riparazione delle ferite e rigenerazione tissutale; stimolazione indiretta dell'angiogenesi.
NGFR	Chinasi tropomiosina-connesse TrkA TrkB TkC	Fattore di crescita dei nervi (NGF)	Crescita e la sopravvivenza delle cellule neuronali.
HGFR	Recettore del fattore di crescita epatocitario Met	Fattore di crescita epatocitario (HGF)	Espresso principalmente nelle cellule epiteliali, ma anche nelle cellule dell'endotelio dei vasi sanguigni e linfatici, cellule neurali, epatociti, cellule emopoietiche e periciti. Angiogenesi, riparazione delle ferite e rigenerazione tissutale.
Ephr	Recettori efrinici Epha Ephb	Efrine A e B	Stimolazione dell'angiogenesi, migrazione di cellule e assoni.
TAM	Axl	Gene specifico di arresto della crescita 6 (GAS6), Proteina S	Fisiologicamente espresso in oligodendrociti, cellule microgliali, monociti/macrofagi, piastrine, cellule endoteliali, muscolo scheletrico, fegato, rene e testicolo. Sopravvivenza e proliferazione cellulare, immunomodulazione e fagocitosi.
TIE	TIE1 TIE2 <i>(Tunica Internal Endothelial Cell Kinase)</i>	Angiopietine (Ang1-Ang4)	Fisiologicamente espresso in cellule staminali emopoietiche e cellule endoteliali. Reclutamento dei periciti e delle cellule muscolari lisce e mantenimento dell'integrità dei vasi.
RET	RET <i>(Rearranged during Transfection)</i>	Fattore neurotrofico di origine gliale (GDNF)	Fisiologicamente espresso in cellule parafollicolari, paratiroidi e midollare delle surrenali. Crescita, differenziazione e migrazione delle cellule derivate dalle creste neurali.
LTK	ALK <i>(Anaplastic Lymphoma Kinase)</i>	Midchina (MDK) e pleiotrofina (PTN)	Fisiologicamente espresso dai precursori delle cellule neurali durante lo sviluppo embrionale. Nella vita postnatale l'espressione persiste a livello di talamo, bulbo olfattorio e mesencefalo. Sviluppo e mantenimento del sistema nervoso.

Tabella 1.1 Ligandi e funzioni biologiche dei principali recettori tirosinchinasi.

Recettori tirosinchinasi	Ligandi	Principali effetti biologici
EGFR		
Recettori per il fattore di crescita dell'epidermide EGFR ErbB2/HER2/neu ErbB3/HER3 ErbB4/HER4	EGFR: fattore di crescita dell'epidermide (EGF), fattore di crescita trasformante <i>alfa</i> (TGF- α), antifeguline; EGFR, ERBB4: betacelluline, epireguline, EGF legante l'eparina; ErbB3, ErbB4: neoreguline	Fisiologicamente espressi nelle cellule epiteliali durante lo sviluppo embrionale e la vita postnatale (apparato gastroenterico, respiratorio, genitale, urinario, mammario, cute). Sviluppo embrionale e placentare, riparazione delle ferite, sviluppo della ghiandola mammaria.
InSR		
Recettore dell'insulina InSR	Insulina	Regolazione del metabolismo glucidico e della sintesi proteica
Recettori per i fattori di crescita simil-insulinici IGF1R	Fattore di crescita simil-insulinico (IGF1, IGF2)	Regolazione della crescita e della maturazione sessuale; mantenimento funzionale e strutturale dei tessuti adulti.
PDGFR		
Recettori per il fattore di crescita di derivazione piastrinica PDGFRα PDGFRβ	Fattori di crescita di derivazione piastrinica (PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, -DD)	Sopravvivenza, crescita, proliferazione, differenziazione di fibroblasti, periciti, cellule gliali e mesangiali; regolazione dell'aggregazione piastrinica nei processi di riparazione delle ferite; mantenimento della pressione osmotica dei liquidi interstiziali.
Recettore per il fattore delle cellule staminali Kit (SCFR) Recettori per il fattore stimolante le colonie CSF1R	Fattore delle cellule staminali (SCF) Fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF)	Fisiologicamente espresso in cellule staminali emopoietiche, mastociti, cellule germinali, melanociti e cellule di <i>Cajal</i> . Differenziazione maturativa delle cellule staminali pluripotenziali; sviluppo fetale. Proliferazione e la differenziazione dei monociti/macrofagi.
Flt3/Flk2	Flt3-L	Fisiologicamente espresso nelle cellule staminali emopoietiche nel midollo osseo. Sviluppo e differenziazione delle cellule staminali, dei precursori dei linfociti B, delle cellule dendritiche e dei linfociti <i>natural killer</i> .
VEGFR		
Recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGFR1 (Flt1) VEGFR2 (KDR, Flk1) VEGFR3 (Flt4)	Fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF-A, -B, -C, -D, -E)	Fisiologicamente espressi nella vita postnatale dalle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (VEGFR-1, VEGFR-2) e linfatici (VEGFR-3, VEGFR-1, VEGFR-2). Vasculogenesi (VEGFR-2) e angiogenesi (VEGFR-1); proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule endoteliali; aumento della permeabilità vasale; inibizione indiretta dei fenomeni apoptotici; aumento dell'emivita delle cellule endoteliali.

segmento che, nel recettore attivato, si lega ai trasduttori intracellulari del segnale [Müller-Esterl, 2007].

La maggior parte dei recettori per i fattori di crescita sono monomerici ed enzimaticamente inattivi in assenza di ligando e dotati di una singola catena polipeptidica che attraversa una sola volta la membrana plasmatica [Müller-Esterl, 2007].

Fa eccezione la classe dei recettori dell'insulina, costituiti da un dimero di due subunità identiche, ciascuna formata da una coppia di catene polipeptidiche *alfa* e *beta* legate tramite un ponte cisteinico. Le catene *alfa* sporgono sulla superficie esterna della membrana plasmatica e contengono il dominio con il sito di legame per l'insulina, mentre i domini intracellulari delle catene *beta* contengono il sito attivo della protein-chinasi. A questa classe appartengono anche il recettore per i fattori di crescita simil-insulinici (IGF1R) [Alberts *et al.*, 2009].

Meccanismo di attivazione

In seguito all'interazione con il ligando specifico, si ha la *dimerizzazione* del recettore. La dimerizzazione, vale a dire l'associazione di due molecole del recettore, può avvenire secondo diversi meccanismi: così ad esempio PDGF può afferrare come una "pinza" due molecole di recettore; in questo modo i due domini catalitici vengono a trovarsi a contatto diretto [Alberts *et al.*, 2009]. Nel caso del recettore di EGF è probabile che il legame con il peptide induca un cambiamento di conformazione nel dominio extracellulare, facilitando le interazioni recettore-recettore, e pertanto la dimerizzazione. Quanto al recettore insulinico, due unità di recettore sono già associate fra loro allo stato fondamentale: si suppone che in questo caso i domini intracellulari si trovino distanti fra loro nello stato non attivato e si avvicinino solo in seguito al legame dell'insulina. La dimerizzazione stabilizza lo stato attivo della chinasi e porta in sua prossimità il dominio intracellulare di un altro recettore. Conseguentemente si verifica una *transfosforilazione* (fosforilazione reciproca) dei recettori a livello dei residui di tirosina situati sia all'interno che all'esterno del dominio catalitico [Alberts *et al.*, 2009]. La fosforilazione delle tirosine al di fuori del dominio catalitico ha l'importante funzione di creare dei "siti di ancoraggio" per proteine-ponte intracellulari. Queste proteine adattatrici sono spesso fosforilate direttamente dalla tirosinchinasi recettoriale (si parla di *fosforilazione del substrato*) e servono da piattaforma per l'assemblaggio di altre componenti delle cascate intracellulari del segnale. In questo modo il recettore attivato si circonda di proteine che immettono il messaggio esterno nel sistema di segnalazione intracellulare su molteplici livelli. L'impalcatura delle proteine segnale può comprendere anche gli effettori di altre vie di segnalazione recettoriale, ricollegando in tal modo differenti segnali esterni. In pratica, in seguito a uno stimolo esterno, si attiva all'istante nel *citofosol* una rete di *pathway* molecolari che, dopo la remissione dello stimolo, si disgrega altrettanto rapidamente. In questo modo una cellula può elaborare efficacemente anche elevate frequenze di segnali in entrata.

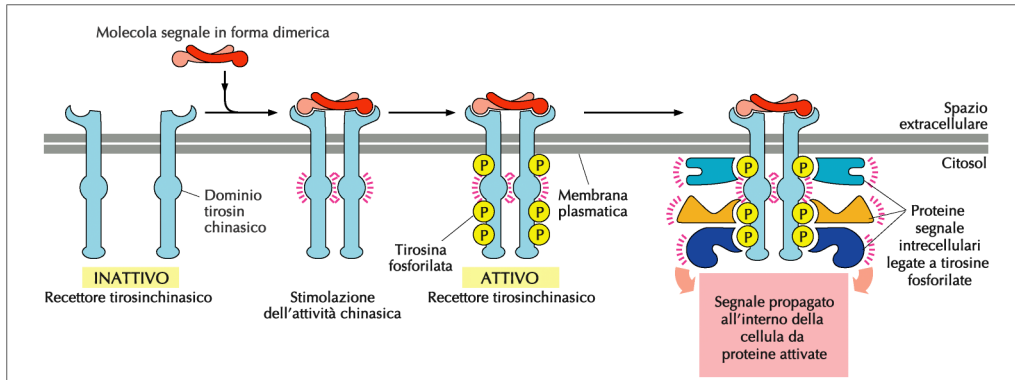


Figura 1.2 Meccanismo di attivazione dei recettori tirosinchinasici (modificato da Alberts et al., 2009).

Non appena formati, i siti di fosfotirosina reclutano proteine intracellulari che presentano domini SH2 (*domini omologhi a Src di tipo 2*), che furono caratterizzati per la prima volta nella tirosinchinasi *Src* del virus del *sarcoma di Rous*. Domini ancora di tipo SH2 si trovano in molte proteine implicate nei segnali a cascata e sono dotate di un duplice sistema di riconoscimento per la proteina bersaglio. Questo conferisce loro una notevole selettività nel legame con i RTK, assicurando la specificità delle vie del segnale "a valle" [Blume-Jensen e Hunter, 2001].

Molti RTK, ad esempio EGFR, portano all'attivazione della proteina *Ras*, un interruttore primario della trasduzione intracellulare del segnale. *Ras*, scoperto per la prima volta nel virus del sarcoma dei ratti, appartiene alla famiglia delle *proteine G monomeriche*, che sono "ormeggiate" alla membrana plasmatica per mezzo di un'ancora lipidica. *Ras* mette in azione una cascata di segnali che porta infine all'attivazione di chinasi effettrici nel *citiosol*, e da qui i segnali vengono inoltrati al nucleo. La staffetta del segnale è portata avanti dalla via del segnale delle *MAP-chinasi*, uno snodo centrale della cellula eucariota, in cui confluiscono numerose sequenze di segnalazione che regolano funzioni basilari come la divisione e la differenziazione cellulare. Il segnale a breve vita di *Ras* è dunque tradotto, grazie alla cascata delle *MAP-chinasi*, in una modificazione dell'espressione genica, che comporta a sua volta una trasformazione durevole dell'attività della cellula. La forte specificità e selettività delle vie del segnale intracellulare si basa sulla connessione mirata di una complessa rete di proteine che recepiscono i segnali in arrivo, li collegano e li smistano, per poi dissociarsi di nuovo rapidamente [Müller-Esterl, 2007].

I RTK svolgono un ruolo primario nello sviluppo embrionale, nel metabolismo e nella regolazione della funzione immunitaria. Nella vita post-nata intervengono nei processi di rigenerazione, riparazione delle ferite e formazione di nuovi vasi. Le funzioni biologiche delle principali famiglie di RTK sono riportate nella **Tabella 1.1**. Lo sviluppo del sistema vascolare è dato da un processo a due passaggi. Nel

primo, riferito come *vasculogenesi*, le cellule endoteliali si differenziano a formare una rete di vasi interconnessi. Nel secondo passaggio, *l'angiogenesi*, i vasi sono rimodellati ed estesi e un supporto di cellule non endoteliali sono reclutati da vasi in maturazione. Il processo di vasculogenesi richiede il *recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare di tipo 2* (VEGFR2), mentre l'angiogenesi richiede il *recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare di tipo 1* (VEGFR1), oltre a PDGFR (*recettore del fattore di crescita di derivazione piastrinica*), espresso in cellule stromali e periciti e FGFR (*recettore del fattore di crescita dei fibroblasti*), espresso da fibroblasti e cellule endoteliali, che agisce anche indirettamente inducendo l'espressione di VEGF. TIE (*tunica internal endothelial cell kinase*) 1 e 2, infine, sono implicati nel reclutamento dei periciti e delle cellule muscolari lisce e nel mantenimento dell'integrità vascolare [London, 2004].

Bibliografia

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecolare della cellula*. V ed., Zanichelli, Bologna, 2009: 956-959.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001; **411**: 355-365.
- Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry* 2000; **69**: 373-398.
- London C. Kinase inhibitors in cancer therapy. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 177-193.
- Müller-Esterl. *Biochimica*. Idelson-Gnocchi, Napoli, 2007: 502-514.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; **19**: 5548-5557.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 2001 **8**: 161-173.

Ruolo dei recettori tirosinchinasici nell'oncogenesi e nella progressione neoplastica

2.1 Meccanismi di disregolazione

Nei tumori dell'uomo sono state identificate numerose disfunzioni riguardanti i recettori tirosinchinasici (**Tabella 2.1**), che possono verificarsi attraverso molteplici meccanismi.

In alcuni casi, mutazioni dei geni che codificano i RTK possono indurre un'attivazione dell'attività chinasi in assenza di un appropriato segnale extracellulare (*attivazione costitutiva*). Tali mutazioni possono risultare nella semplice sostituzione di un aminoacido (*polimorfismi a base singola*), oppure in una delezione o un'inserzione, in genere per effetto di *internal tandem duplications* (ITD) [London, 2004]. Un esempio riguarda *Kit*, un RTK normalmente espresso in cellule staminali emopoietiche, melanociti, mastociti e cellule del sistema nervoso centrale [Galli *et al.*, 1994]. Mutazioni puntiformi e piccole delezioni del proto-oncogene *c-Kit* sono presenti nel 50% circa dei pazienti umani con tumori gastrointestinali stromali (GIST) [Hirota *et al.*, 1998; Lasota *et al.*, 1999; Lux *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001]. La maggior parte di queste mutazioni è a carico dell'esone 11, che codifica per il dominio juxtamembrana di *Kit*. Questa regione della proteina svolge, tra le altre funzioni, quella di inibire l'attivazione del recettore, impedendo la dimerizzazione spontanea. Inoltre a questo livello si trova il sito di legame delle fosfatasi, che possono regolare l'attività del recettore defosforilandolo e modulando la durata del segnale. Mutazioni a questo livello precludono pertanto la possibilità di regolare l'attività del recettore [London, 2004]. Nella leucemia mieloide acuta dell'uomo, ITD di *Flt3* (un RTK appartenente alla famiglia di *Kit* e PDGFR) sono riscontrate nel 30% dei pazienti [Yokota *et al.*, 1997; Iwai *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1999]. Analogamente a quanto

accade per *Kit*, queste mutazioni riguardano l'esone 11 e inducono un'attivazione costitutiva della proteina. Le mutazioni di *Flt3* sono state associate a un aumentato rischio di ricomparsa della malattia e a una riduzione dei tempi di sopravvivenza. Un terzo esempio è rappresentato da mutazioni puntiformi del RTK EGFR nei tumori polmonari non microciticici (NSCLC) dell'uomo, riscontrate più frequentemente negli adenocarcinomi e in pazienti non fumatori di sesso femminile e nazionalità asiatica [Lynch *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007]. Queste mutazioni, globalmente denominate EGFRvIII, sono per la maggior parte delezioni *inframe* a livello di esone 19, sostituzioni *missense* nell'esone 21 o inserzioni negli esoni tra il 18 e il 21 [Johnson e Janne, 2005; Uramoto e Mitsudomi, 2007] e determinano un prolungamento della trasduzione del segnale dopo stimolazione da parte del ligando.

Le chinasi possono inoltre andare incontro a disregolazione mediante la generazione di *proteine di fusione*. In questi casi una porzione della proteina (solitamente quella che possiede attività enzimatica) si lega a un altro gene; la conseguenza è che i meccanismi che presiedono alle normali funzioni della proteina saltano. Esempi di proteine di fusione che coinvolgono le chinasi sono TEL-PDGFRB nella leucemia mielomonocitica cronica, o FIP1-PDGFR α nella sindrome iperesosinofilica associata a mastocitosi [London, 2004].

In numerose neoplasie dell'uomo si osservano inoltre l'*amplificazione genica* e/o la *sovraespressione* dei RTK, che possono essere dovute ad amplificazione diretta (*i.e.* copie multiple di geni) oppure a perdita del normale controllo della regolazione trascrizionale a causa della traslocazione del gene in prossimità di un altro gene altamente espresso. La sovraespressione può portare a un'aumentata risposta delle cellule tumorali a livelli normali di ligando. In alternativa, se l'espressione è sufficientemente elevata, la chinasi può attivarsi mediante dimerizzazione spontanea in assenza di ligando. In entrambi i casi, ne derivano segnali a cascata anomali, che inducono una proliferazione cellulare incontrollata [London, 2004]. Un classico esempio riguarda HER2 (ErbB), appartenente alla classe dei recettori del fattore di crescita epidermico [Zwick, 2001]. Una sovraespressione/amplificazione genica di HER2 si riscontra frequentemente in carcinomi ovarici e neoplasie mammarie [Slamon *et al.*, 1987; Paik *et al.*, 1990; Zwick, 2001], ed è dimostrato come in queste ultime elevati livelli del recettore siano associati a una prognosi sfavorevole [Paik *et al.*, 1990]. EGFR, che appartiene alla stessa famiglia di HER2, è sovraespresso in numerosi tumori epiteliali maligni dell'uomo, come carcinomi polmonari, uroteliali, della cervice, dell'ovaio, del rene e del pancreas [Laskin e Sandler, 2004]. Nella maggior parte dei casi la sovraespressione è dovuta ad amplificazione genica e in alcuni tumori si possono raggiungere anche 60 copie del gene per ogni cellula [Liebermann *et al.*, 1985]. Analogamente a quanto accade per HER2, la sovraespressione di EGFR è legata a una prognosi peggiore, a un più elevato tasso metastatico e a una maggiore attività proliferativa tumorale [Laskin e Sandler, 2004].

Un ulteriore meccanismo di disregolazione è rappresentato dall'*attivazione*

Tabella 2.1 Principali disregolazioni dei recettori tirosinchinasici in oncologia umana (modificato da Blume-Jensen e Hunter, 2001).

Recettori tirosinchinasici	Meccanismi di disregolazione	Ruolo in oncologia
EGFR		
EGFR	Sovraespressione (amplificazione)	Carcinomi mammari, ovarico, coloretale, esofageo, gastrico, endometriale, pancreatico, uroteliale, HNSCC
	Mutazioni puntiformi (EGFRvIII)	NSCLC
ErbB2/HER2/neu	Sovraespressione (amplificazione)	Carcinomi mammari, ovarico, gastrico, coloretale, NSCLC
InsR		
IGF1R	Sovraespressione	Sarcomi, carcinoma cervicale, carcinoma renale, carcinomi mammari
PDGFR		
PDGFRα, PDGFRβ	Sovraespressione (amplificazione) Proteina di fusione Mutazioni	Glioblastoma, glioma, carcinoma ovarico Leucemia mielomonocitica cronica GIST
CSF1R	Mutazioni puntiformi Sovraespressione	Leucemia mielomonocitica acuta e cronica, istiocitosi maligna, glioma
Kit	Mutazioni puntiformi e delezioni Espressione aberrante	Leucemia mieloide acuta, GIST, mastocitosi, seminomi Carcinomi polmonari primitivi
Flt3/Flk2	ITD dominio juxtamembrana Sovraespressione	Leucemia mieloide acuta, tumori emopoietici
VEGFR		
VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR	Espressione Stimolazione autocrina	Angiogenesi tumorale Melanoma
VEGFR3/Flt4	Sovraespressione	Angiogenesi tumorale, tumori di origine vascolare (sarcoma di Kaposi, emangiosarcoma, linfangiosarcoma)
FGFR		
FGFR1, FGFR3	Proteina di fusione	Leucemia mieloide acuta, linfoma, mieloma multiplo
FGFR2, FGFR4	Sovraespressione	Carcinoma gastrico, mammario, ovarico, prostatico
NGFR		
TrkA, TrkB, TrkC	Proteina di fusione	Carcinoma papillare della tiroide, neuroblastoma, fibrosarcoma congenito, leucemia mieloide acuta
Met		
Met	Espressione aberrante Sovraespressione Mutazioni puntiformi	Carcinoma papillare della tiroide Osteosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma epatocellulare Carcinoma renale
EphR		
EphA	Sovraespressione	Melanoma metastatico
EphB	Sovraespressione	Carcinoma esofageo, gastrico, coloretale, mammario
TAM		
Axl	Sovraespressione	Leucemia mieloide acuta
TIE		
TIE1	Sovraespressione	Emangioblastoma, tumori perivascolari, adenocarcinoma gastrico
TIE2	Espressione	Angiogenesi tumorale
RET		
RET	Mutazioni puntiformi	Tiroide, neoplasie endocrine multiple (MEN2A, MEN2B)
LTL		
ALK	Proteina di fusione	Linfoma non Hodgkin, NSCLC

HNSCC = Carcinoma squamocellulare cervicofacciale; NSCLC = Carcinoma polmonare non microcitico; GIST = Tumori gastrointestinali stromali.

autocrina. In questi casi il tumore esprime contemporaneamente recettore e ligando e l'uno o l'altro sono generalmente anche sovraespressi. Poiché la stimolazione del recettore da parte del ligando è un processo strettamente regolato e, in molti casi, i livelli di ligando sono limitanti, questa coespressione porta a lungo termine a un'attivazione costitutiva del recettore. Alcuni esempi riguardano la coespressione di TGF α e EGFR nel glioblastoma e nel carcinoma squamocellulare, la coespressione del fattore di crescita simil-insulinico (IGF) e del suo recettore IGF1R nei tumori mammari e coloretali, o la coespressione di VEGF e VEGFR nel melanoma [Ekstrand *et al.*, 1991; Graeven *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 1999; Zwick, 2001]. Nella maggior parte dei casi, l'instaurarsi di un meccanismo stimolazione autocrina è collegato a una prognosi peggiore.

L'ultima categoria di disregolazioni riguarda l'*espressione aberrante*. In questi casi le cellule neoplastiche esprimono un RTK normalmente non espresso da parte del corrispondente tessuto normale. Esistono vari esempi di espressione aberrante di RTK in oncologia umana, i più rappresentativi sono *Kit* nei carcinomi polmonari primitivi e *Met* nel carcinoma papillare della tiroide [Pietsch *et al.*, 1998; Zanetti *et al.*, 1998]. In alcuni casi l'espressione aberrante è associata a una prognosi sfavorevole, nonostante gli effetti biologici di questa disregolazione siano ancora in parte sconosciuti [London, 2004].

2.2 Metodi di valutazione

È sempre più evidente l'utilità dell'impiego dei RTK come *biomarker prognostici*, in grado cioè di fornire informazioni sul comportamento biologico delle neoplasie e come *indicatori predittivi*, per sondare il potenziale livello di risposta a una terapia con TKI. La consapevolezza dell'esistenza di una notevole variabilità molecolare intertumoreale porta ad allontanarsi dalla visione del tumore come singola entità e ad individuare delle sottocategorie basate sui profili di espressione genica. Questo si traduce in un avvicinamento al concetto di *terapia individuale*, elaborata sulla base delle indicazioni fornite dai *biomarker* prognostici e predittivi [Holden *et al.*, 2008; John *et al.*, 2009; Lowery e Han, 2011].

Per realizzare a pieno le potenzialità di queste nuove informazioni sarà necessario integrare le metodiche di analisi molecolare al lavoro di diagnostica di routine. In un futuro non lontano è lecito ipotizzare che il patologo avrà il compito non soltanto di stabilire il tipo cellulare coinvolto in un determinato processo neoplastico, ma anche di fornire un'analisi delle alterazioni molecolari presenti. Poiché la disregolazione dei RTK può avvenire secondo numerosi meccanismi diversi, non esiste un metodo di valutazione univoco e in medicina umana sono in fase di comparazione diversi saggi molecolari [Holden *et al.*, 2008; Lowery e Han, 2011].

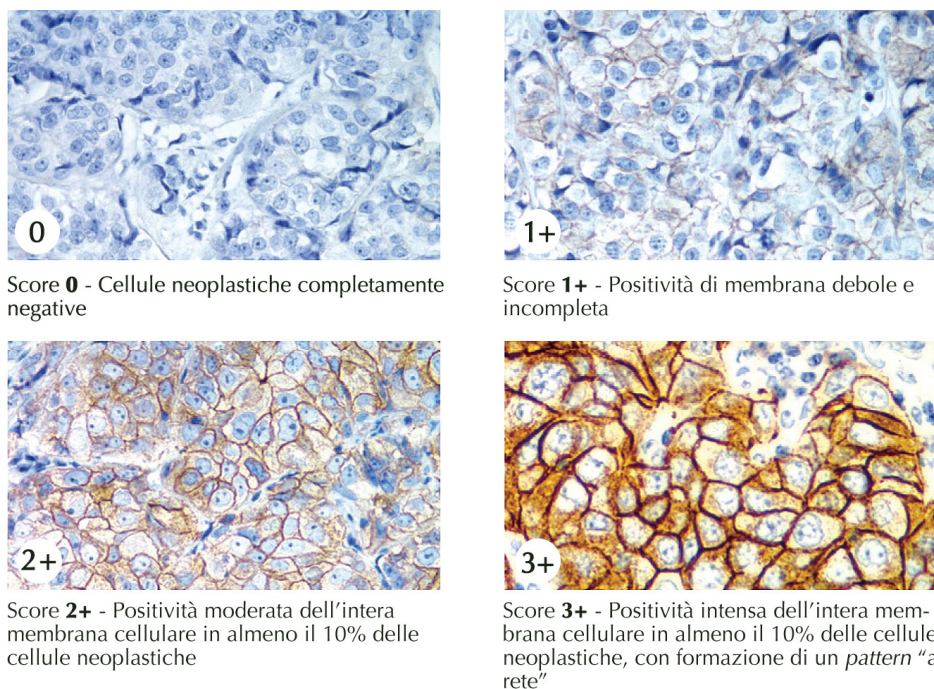


Figura 2.1 Sistema di scoring approvato dalla FDA per la valutazione della positività immunocitochimica per HER2 mediante HercepTest™.

Per mettere in evidenza i livelli di *espressione proteica* possono essere utilizzati metodiche come citometria a flusso, ELISA, *Western blot* e immunocitochimica [John *et al.*, 2009]. Le prime tre sono di tipo quantitativo e richiedono l'estrazione della proteina da tessuto fresco o congelato; necessitano inoltre di apparecchiature specifiche ed economicamente più onerose [Dei Tos e Ellis, 2005]. Inoltre, poiché la proteina è estratta da un intero campione di tessuto, limitare i risultati alle sole cellule neoplastiche può essere problematico. Questi metodi hanno però il vantaggio della riproducibilità, di garantire una determinazione quantitativa precisa e di poter effettuare valutazioni anche su liquidi biologici. L'immunocitochimica (IIC) è attualmente il metodo più comunemente utilizzato per valutare l'espressione cellulare di una proteina. La sua diffusione è legata al fatto che si tratta di una tecnica di semplice esecuzione, integrata da decenni nella diagnostica istopatologica di routine, che non presuppone l'utilizzo di apparecchiature costose. Può essere eseguita su tessuto fissato in formalina e ha il vantaggio di preservare l'architettura dei tessuti e la morfologia cellulare e può quindi fornire informazioni riguardanti i tipi cellulari coinvolti e la distribuzione della molecola bersaglio nel campione. I limiti sono tuttavia rappresentati dalla scarsa standardizzazione della metodica e dalla soggettività dell'interpretazione di risultati. La veridicità e la qualità delle informazioni fornite, e di conseguenza la riproducibilità della metodica, sono fortemente legate alla qualità dei reagenti utilizzati e

alle criticità presenti in tutte le fasi del processo. Queste includono i tempi di fissazione e il tipo di fissativo utilizzato, le caratteristiche degli anticorpi primari e secondari, il sistema di rivelazione e l'interpretazione da parte del patologo [Atkins *et al.*, 2004; Dei Tos e Ellis, 2005]. Ulteriori inconvenienti sono rappresentati dall'eterogeneità del campione e dalle possibili variazioni della positività a seconda della regione esaminata [Goldstein e Armin, 2001; Dei Tos e Ellis, 2005]. Per limitare questi problemi, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha elaborato procedure e sistemi di *scoring* standardizzati per la rivelazione dell'espressione di HER2 ed EGFR, nel tentativo di identificare pazienti eligibili per l'inclusione in *trial* clinici con *cetuximab* e *trastuzumab* (*HercepTest*[™] e *pharmDx*[™], Dako) (Figura 2.1). I kit sono validati per l'utilizzo su sezioni istologiche di tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina. Nonostante questo approccio rappresenti un miglioramento, non può certo ovviare a tutti i limiti delle variabili preanalitiche descritte. Questo fa sì che l'immunoistochimica non si presti a una vera e propria analisi di tipo quantitativo e possa essere definita, nella migliore delle ipotesi, una tecnica semiquantitativa. Ciononostante in diversi studi si è cercato di usare l'IIC per "misurare" i livelli di positività e metterli in relazione con la prognosi e la risposta alla terapia. A tale scopo i ricercatori hanno utilizzato sistemi di analisi di immagine e hanno sviluppato algoritmi per attribuire valori numerici alla positività immunoistochimica. Nonostante una certa variabilità, questi metodi si basano tutti sulla definizione della proporzione di cellule positive e sull'intensità della reazione osservata. Data inoltre la variabilità della positività in aree diverse del tumore, anche la scelta del numero di sezioni su cui valutare questi parametri può risultare critica [Dei Tos e Ellis, 2005]. Uno studio comparativo sull'utilizzo di diversi metodi di *scoring* per la valutazione della positività immunoistochimica per EGFR ha concluso che le determinazioni erano tanto più accurate quanto più semplice e descrittivo era il sistema utilizzato e studi successivi sottolineano l'utilità prognostica delle analisi di tipo qualitativo, come appunto l'IIC, per determinare la citolocalizzazione del segnale [Adams *et al.*, 1999; Langner *et al.*, 2004].

A partire dagli anni ottanta sono stati messi in commercio anticorpi specifici per identificare solo le proteine nello stato fosforilato (e quindi attivate). I *phosphorylation state-specific antibodies* (PSSA) hanno ricevuto nell'ultimo decennio un'attenzione considerevole in oncologia per la possibilità di fornire un'effettiva valutazione della funzionalità delle vie di segnalazione attive a livello intracellulare e, di conseguenza, per il loro notevole potenziale prognostico e predittivo [Mandell, 2008]. Tuttavia, dopo il primo entusiasmo, un elevato numero di studi ha fallito nel dimostrare un reale vantaggio dell'utilizzo di questi anticorpi. Inoltre vi sono parecchie perplessità sulla reale corrispondenza tra il *pattern* di positività immunoistochimica e il reale *status* di fosforilazione *in vivo* [Mandell, 2008].

Le informazioni genetiche effettive, che definiscono in modo univoco le caratteristiche cellulari, sono quelle trascritte in RNA messaggero (mRNA); come tale,

l'espressione di mRNA è più direttamente responsabile del fenotipo cellulare rispetto al DNA genomico [Khanna e Paoloni, 2007]. Metodi per la rilevazione e la quantificazione di specifiche sequenze di mRNA cellulare sono *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) e *Northern Blot*.

La quantificazione diretta del numero di copie di geni può essere effettuata invece utilizzando ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) e *Southern blot*. La FISH è una metodica che permette di rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi. Può essere condotta su materiale fissato in formalina e incluso in paraffina e utilizza sonde a fluorescenza che si legano in modo estremamente selettivo ad alcune specifiche regioni del cromosoma; i siti di legame vengono poi visualizzati mediante microscopia a fluorescenza [John *et al.*, 2009]. Queste tecniche sono indicate nei casi in cui la sovraespressione proteica sia determinata esclusivamente dall'amplificazione genica, negli altri casi non necessariamente riflettono i livelli di proteina prodotta e potrebbero sottostimare i casi positivi. Rispetto all'immunoistochimica si tratta di metodiche più costose e tecnicamente complesse, ma meno soggette a variabili e che si prestano a un'interpretazione di tipo quantitativo. Nei tumori mammari dell'uomo esiste un buon livello di correlazione tra espressione immunoistochimica e stima dell'amplificazione genica tramite FISH e quest'ultima è considerata un indicatore prognostico estremamente accurato [Pauletti *et al.*, 2000]. Nel caso di EGFR invece i due parametri non sembrano in relazione tra loro e l'immunoistochimica rappresenta tutt'ora il metodo di valutazione più accurato [Kersting *et al.*, 2004; Dei Tos e Ellis, 2005].

Qualora la prognosi o la risposta alla terapia siano vincolate alla presenza di specifiche mutazioni, il metodo più utilizzato è il sequenziamento diretto dell'esone coinvolto nella mutazione, previa amplificazione tramite PCR. Sezioni di tessuto tumorale sono dapprima colorate per valutare i tipi cellulari presenti e per determinare la percentuale di cellule tumorali. Nel caso di campioni eterogenei, con una percentuale di cellule tumorali sul totale inferiore al 40%, può essere necessario ricorrere alla *microdissezione laser*. Il DNA è estratto dal tessuto tumorale selezionato utilizzando procedure standard o appositi kit. La sensibilità di questa metodica è limitata dal numero di copie dell'allele mutato, dalle amplificazioni non bilanciate e dalla quantità relativa di alleli *wild-type* contaminanti di cellule non tumorali. L'estrazione da tessuti formalinati e paraffinati può dare inoltre luogo ad artefatti di sequenziamento [Engelman *et al.*, 2006; John *et al.*, 2009].

In conclusione, la possibilità di ottenere informazioni prognostiche e predittive utilizzando i RTK come *marker* rappresenta un grande passo avanti verso il raggiungimento di trattamenti terapeutici personalizzati in oncologia. È pertanto necessario continuare il lavoro di caratterizzazione svolto solo in parte per valutare, a seconda del tipo tumorale e del recettore coinvolto, qual è il meccanismo verosimilmente implicato nella trasformazione neoplastica, nell'evoluzione della malattia e

nella risposta alla terapia. Sulla base di queste informazioni, occorre poi trovare il metodo più adatto per identificare e, se necessario, quantificare le disregolazioni presenti. Al momento l'immunoistochimica resta probabilmente il metodo di *screening* migliore per valutare la presenza e la distribuzione dell'espressione dei RTK, ma il raggiungimento di una maggiore standardizzazione della metodica costituisce un obiettivo di fondamentale importanza [Dei Tos e Ellis, 2005; Holden *et al.*, 2008].

2.3 Terapie a bersaglio molecolare

Negli ultimi dieci anni, sono stati compiuti numerosi sforzi per mettere a punto farmaci in grado di inibire le chinasi implicate nei processi neoplastici, sia a livello di cellule tumorali che di cellule endoteliali, allo scopo di inibire l'angiogenesi. La determinazione della struttura cristallografica dei principali *target* terapeutici ha facilitato enormemente questo processo [London *et al.*, 2004]. Di seguito sono trattate le principali strategie farmacologiche sviluppate allo scopo di bloccare l'attività chinasi dei RTK.

Inibitori peptidici

I RTK all'interno delle stesse famiglie utilizzano come substrati enzimatici sequenze peptidiche in gran parte conservate. Modificando leggermente la sequenza peptidica, la molecola che ne risulta può agire da "pseudo substrato" che si lega alla chinasi, bloccandone il sito di attivazione e impedendo alla vera molecola di legarsi, bloccando la propagazione del segnale all'interno della cellula [Al-Obeidi e Lam, 2000]. Gli inibitori peptidici funzionano molto bene *in vitro* in ambiente controllato, ma nella maggior parte dei casi sono incapaci di penetrare all'interno di cellule intatte e di raggiungere il loro sito di legame preposto. Quindi, nonostante si siano rivelati utili nello studiare il meccanismo di azione delle chinasi, non sono probabilmente adeguati per essere utilizzati in un contesto terapeutico [London *et al.*, 2004].

Anticorpi anti-recettore

Gran parte delle chinasi che intervengono nella proliferazione delle cellule neoplastiche e delle cellule endoteliali sono recettori per fattori di crescita. Sono stati realizzati in laboratorio anticorpi che hanno come bersaglio il dominio extracellulare di questi recettori. Questo impedisce il legame con il fattore di crescita e può inoltre indurre una risposta immunitaria diretta contro la cellula che esprime il recettore. Un altro potenziale effetto di tali anticorpi è la generazione di un segnale intracellulare inappropriato in grado di provocare la morte della cellula. Questo tipo di strategie sono state applicate con un discreto successo in certi tipi di tumore, in ogni caso è necessaria la sintesi di anticorpi specie-specifici e l'eventualità di una risposta immunitaria da parte dell'ospite potrebbe limi-

Tabella 2.2 Farmaci a bersaglio molecolare maggiormente utilizzati in medicina umana.

TKI	Prodotto e casa farmaceutica	Categoria	Target	Tumori
Panitumumab	<i>VectibixTM, Amgen</i>	Ab monoclonale	EGFR	Carcinoma coloretale
Cetuximab	<i>ErbituxTM, ImClone</i>	Ab monoclonale	EGFR	Carcinoma squamocellulare cervicofacciale; carcinoma coloretale
Erlotinib	<i>TarcevaTM, Genetech</i>	Molecola ad azione inibente	EGFR	NSCLC, carcinoma pancreatico
Gefitinib	<i>IressaTM, Astra Zeneca</i>	Molecola ad azione inibente	EGFR	NSCLC
Trastuzumab	<i>HerceptinTM, Genetech</i>	Ab monoclonale	HER2	Carcinoma mammario
Imatinib	<i>GleevecTM, Novartis</i>	Molecola ad azione inibente	<i>Bcr-abl, Kit, PDGFR, CSF1R</i>	Leucemia mieloide cronica, GIST
Sunitinib	<i>SutentTM, Pfizer</i>	Molecola ad azione inibente	PDGFR, VEGFR (famiglie)	Carcinoma renale, polmonare, epatocellulare, GIST
Sorafenib	<i>NexavarTM, Bayer</i>	Molecola ad azione inibente	PDGFR, VEGFR	Carcinoma renale, polmonare, epatocellulare
Bevacizumab	<i>AvastinTM, Genetech</i>	Ab monoclonale	VEGFR	Carcinoma coloretale, polmonare

NSCLC = Carcinoma polmonare non microcitico; GIST = Tumori gastrointestinali stromali.

tarne l'efficacia terapeutica [London *et al.*, 2004].

Trastuzumab (*HerceptinTM, Genetech*) è stato il primo anticorpo monoclonale approvato dalla FDA. Ha come *target* HER2, sovraespresso approssimativamente nel 30% dei tumori della mammella e in altri carcinomi, come quello della prostata, dell'ovaio e in NSCLC [Harris, 2004]. Come farmaco singolo di prima linea nel tumore mammario metastatico, le risposte sono state circa del 25% [Vogel *et al.*, 2001], mentre in combinazione con altri chemioterapici (*paclitaxel* o *doxorubicina*), si è raggiunto il 50% (Slamon *et al.*, 2001). *Herceptin* è attualmente utilizzato come trattamento adiuvante per i tumori mammari che sovraesprimono HER2 metastatici e non, in associazione alla chemioterapia citotossica [Halper *et al.*, 2010].

Cetuximab (*ErbituxTM, Imclone*) e *panitumumab* (*VectibicTM, Amgen*) sono anticorpi monoclonali anti-EGFR (ErbB1), che sono stati approvati in monochemioterapia per il trattamento dei carcinomi coloretali metastatici EGFR-positivi [Halper *et al.*, 2010].

Poiché i tumori hanno bisogno di vasi sanguigni per la loro crescita e invasione, inibire l'angiogenesi tumorale oltre a colpire direttamente le cellule tumorali è una delle strategie più utilizzate. *Bevacizumab* (*AvastinTM, Genetech*) è un anticorpo monoclonale anti-VEGFR e, somministrato in associazione alla chemioterapia citotossica, ne incrementa l'efficacia con la sua attività antiangiogenetica [Halper *et al.*, 2010].

Piccole molecole ad azione inibente

Come descritto, i RTK agiscono fosforilando loro stesse e altre proteine per generare segnali intracellulari a cascata; devono pertanto legare ATP per fornire un gruppo fosfato al dominio catalitico, che possiede attività enzimatica; se non è fornito ATP, la fosforilazione non può avere luogo. Si è cercato pertanto di bloccare il sito legante ATP delle chinasi per neutralizzare la loro attività. Tuttavia non sarebbe vantaggioso bloccare indiscriminatamente l'attività di tutte le chinasi, dal momento che molte svolgono un ruolo critico per la funzione delle cellule non-neoplastiche. Allo scopo di mettere a punto inibitori specifici, i ricercatori hanno pertanto caratterizzato i siti leganti ATP di numerosi recettori e scoperto che le sequenze tendono ad essere molto ben conservate all'interno delle singole famiglie di RTK [Al Obeidi e Lam, 2004; Scapin, 2002; Madhusudan e Ganesan, 2004; Noble *et al.*, 2004]. Questa informazione è stata utilizzata per sintetizzare inibitori competitivi in grado di interagire selettivamente con il sito intracellulare legante ATP di particolari famiglie di chinasi. Si tratta di molecole a basso peso molecolare che si legano più saldamente dell'ATP e sono in grado di prevenire efficacemente la fosforilazione. Tali molecole hanno il vantaggio di essere facilmente sintetizzabili in grande quantità, di essere biodisponibili per via orale, di poter agevolmente penetrare all'interno delle cellule per raggiungere il proprio *target* e di non indurre una stimolazione del sistema immunitario [London, 2004]. Necessitano di una somministrazione quotidiana per via orale e presentano una tossicità dose-dipendente rappresentata da *rash* cutaneo, nausea, vomito, diarrea e, nell'1% dei casi, una tossicità polmonare che può risultare fatale [Harari, 2004].

Probabilmente ad oggi la molecola ad azione inibente che ha riscontrato il maggiore successo è stata *imatinib mesilato* (*Gleevec*TM, *Novartis*), disegnata per bloccare l'attività della chinasi citoplasmatica *Abl* nei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica [Sawyers, 2002]. *Imatinib* interagisce però anche con il sito legante ATP del recettore tirosinchinasico *Kit*. Come accennato, i tumori gastrointestinali stromali frequentemente possiedono mutazioni attivanti di *Kit* e sono spesso chemioresistenti. *Trial* clinici di *Gleevec* per il trattamento dei GIST hanno ottenuto risposte nel 50-70% dei pazienti, contro il 5% dei chemioterapici tradizionali [Miettinen *et al.*, 1999; Heinrich *et al.*, 2002]. Una minoranza dei GIST non possiede mutazioni di *Kit*, ma presenta invece mutazioni di PDGFR α , appartenente alla stessa famiglia di RTK; questi casi rispondono ugualmente a *Gleevec*, dal momento il farmaco inibisce la fosforilazione anche di PDGFR. In seguito a questi risultati, *Gleevec* è diventato il farmaco di elezione per i pazienti affetti da GIST [Heinrich *et al.*, 2003; London *et al.*, 2004].

Un altro TKI, *sunitinib* (*Sutent*TM, *Pfizer*), è nato come agente antiangiogenetico ed è in grado di inibire l'attività delle famiglie di TKI con dominio tirosinchinasico interrotto (VEGFR e PDGFR) [Smith *et al.*, 1999]. *Sutent* è attualmente allo studio in regime combinato per il trattamento di carcinomi renali, coloretali, epatocellulari ed è al momento considerato il trattamento di elezione per pazienti con carcinoma renale (risposta parziale nel 40% dei casi e malattia stabile nel 25%) [Halper *et al.*, 2010].

Ulteriori esempi sono rappresentati da *erlotinib* (*Tarceva*TM, *Genetech*) e *gefitinib* (*Iressa*TM, *Astra Zeneca*). Entrambe le molecole inibiscono il sito legante ATP di EGFR. Il gruppo dei recettori del fattore di crescita epidermico rappresenta un target terapeutico interessante, dal momento che numerosi tipi di tumori epiteliali, come carcinomi mammari, polmonari, uroteliali e pancreatici, sovraesprimono uno o più membri di questa famiglia [Laskin e Sandler, 2004]. *Iressa* ha dimostrato efficacia clinica nel trattamento dei tumori polmonari non microcitici, con risposte complete o parziali del 12-20% e malattia stabile nel 30-40% dei casi [Laskin e Sandler, 2004; London *et al.*, 2004]. La probabilità di risposta a *Iressa* e ad altri EGFR-inibitori nei NSCLC è strettamente legata alla presenza della mutazione EGFRvIII [Lynch *et al.*, 2004].

Bibliografia

- Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *Journal of Clinical Pathology* 1999; **52**: 75-77.
- Al-Obeidi FA, Lam KS. Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene* 2000; **19**: 5690-5701.
- Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Wintner H, Bonato MS, Störkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004; **52**: 893-901.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001; **411**: 355-365.
- Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *European Journal of Cancer* 2005; **41**: 1383-1392.
- Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology* 1994; **55**: 1-95.
- Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; **92**: 1331-1346.
- Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, et al. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1999, **125**: 621-629.
- Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Research* 1991; **51**: 2164-2172.
- Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2006; **116**: 2695-2706.
- Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Veterinary Pathology* 2010; **47**: 77-97.
- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 2004; **11**: 689-708.
- Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncology* 2004; **5**: 292-302.
- Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT

- activation and cytogenetic alterations. *Human Pathology* 2002; **33**: 484–495.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., *et al.* PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; **299**: 708–710.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; **279**: 577–580.
- Holden JA, Willmore-Payne C, Layfield LJ. Tyrosine kinase activating mutations in human malignancies: implications for diagnostic pathology. *Experimental and Molecular Pathology* 2008; **85**: 68-75.
- Iwai T, Yokota S, Nakao M, *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 1999; **13**: 38–43.
- John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; **28 Suppl 1**: S14-23.
- Johnson BE, Jänne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 2005; **65**: 7525-7529.
- Kersting C, Tidow N, Schmidt H, *et al.* Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Laboratory Investigation* 2004; **84**: 582-587.
- Khanna C, Paoloni MC. Molecular Diagnostics. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed., Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2007; pp. 134-145.
- Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, *et al.* Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Medical Pediatric Oncology* 1999; **33**: 525–529.
- Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation? *Journal of Clinical Pathology* 2004; **57**: 773-775.
- Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treatment Reviews* 2004; **30**: 1–17.
- Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *American Journal of Pathology* 1999; **154**: 53–60.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, *et al.* Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *Journal of Cell Science, Supplement* 1985; **3**: 161–172.
- London C. Kinase inhibitors in cancer therapy. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 177-193.
- Lowery A, Han Z. Assessment of tumor response to tyrosine kinase inhibitors.

- Frontiers in Bioscience* 2011; **17**: 1996-2007.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 2004; **350**: 2129-2139.
- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, *et al.* KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *American Journal of Pathology* 2000; **156**: 791-795.
- Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry* 2004; **37**: 618-635.
- Mandell JW. Immunohistochemical assessment of protein phosphorylation state: the dream and the reality. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; **130**: 465-471.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Human Pathology* 1999; **30**: 1213-1220.
- Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004; **303**: 1800-1805.
- Paik S, Hazan R, Fisher ER, *et al.* Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1990; **8**: 103-112.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, *et al.* Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 2000; **18**: 3651-3664.
- Pietsch T, Nicotra MR, Fraioli R, Wolf HK, Mottolese M, Natali PG. Expression of the c-Kit receptor and its ligand SCF in non-small-cell lung carcinomas. *International Journal of Cancer* 1998; **75**: 171-175.
- Rubin BP, Singer S, Tsao C, *et al.* KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research* 2001; **61**: 8118-8121.
- Sawyers CL. Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets. *Current Opinion in Genetics and Development* 2002, **12**: 111-115.
- Scapin G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discovery Today* 2002; **7**: 601-611.
- Sciacca L, Costantino A, Pandini G, *et al.* Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 1999; **18**: 2471-2479.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Hber DA. Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007; **7**: 169-181.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine* 2001; **344**: 783-792.

- Smith JK, Mamoon NM, Duhe RJ. Emerging roles of targeted small molecule protein-tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Oncology Research* 2004; **14**: 175–225.
- Uramoto H, Mitsudomi T. Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer? *British Journal of Cancer* 2007; **96**: 857–863.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, *et al.* First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 2001; **61 Suppl 2**, 37–42.
- Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; **11**: 1605–1609.
- Zanetti A, Stoppacciaro A, Marzullo A, *et al.* Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA-R) in papillary carcinoma of the thyroid. *The Journal of Pathology* 1998; **186**: 287–291.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 2001 **8**: 161–173.

I recettori tirosinchinasici in oncologia veterinaria

I recettori tirosinchinasici sono espressi o sovraespressi in un elevato numero di tumori spontanei animali, che in molti casi presentano caratteristiche clinico-patologiche simili alle neoplasie dell'uomo. La disregolazione dei recettori tirosinchinasici è pertanto probabilmente coinvolta anche nella patogenesi delle malattie neoplastiche degli animali ma, rappresentando solo una parte della complessa rete di segnali che porta all'evoluzione e alla progressione tumorale, definire la loro precisa rilevanza clinica non è immediato. Ad oggi, la maggior parte degli studi effettuati in medicina veterinaria sono focalizzati sulla valutazione dell'espressione dei RTK nei tessuti neoplastici, ma il loro ruolo nell'oncogenesi o come *target* terapeutici non è ancora stato caratterizzato, se non in rare eccezioni.

Segue una rassegna, per le principali famiglie di recettori tirosinchinasici, degli studi condotti in oncologia veterinaria, con un cenno ai modelli comparativi di riferimento eventualmente presenti in medicina umana.

3.1 Recettori del fattore di crescita epidermico

EGFR

EGFR e gli altri membri della famiglia dei recettori per il fattore di crescita dell'epidermide sono espressi in numerosi tessuti epiteliali e nervosi durante lo sviluppo embrionale e la vita adulta [Henson e Gibson, 2006; Sibilina *et al.*, 2007]. In caso di disregolazione, EGFR può trasformarsi in una potente oncoproteina, in grado di indurre, mediante un'attivazione aberrante delle vie di segnalazione intracellulari, i sei fattori della trasformazione neoplastica (autostimolazione alla crescita, insensibilità ai segnali di inibizione della

crescita, evasione dell'apoptosi, illimitato potenziale replicativo e angiogenico, invasività e metastasi) [Hanahan e Weinberg, 2000]. Nella maggior parte dei casi si instaura un meccanismo di stimolazione della crescita ligando-indipendente, che coincide con una sovraespressione del recettore legata a inibizione dei meccanismi di degradazione o a un'accelerata sintesi proteica [Grandis e Tweardy, 1993; Sorkin e Goh, 2009]. Tutti i recettori ErbB utilizzano come vie effettrici principali la *Ras-Raf-MAPK-chinasi* e la *fosfatidilinositolo 3' chinasi* (PI3K). La prima induce un aumento dell'attività dei fattori di trascrizione che stimolano la proliferazione e attivano la progressione del ciclo cellulare, mentre la seconda inibisce indirettamente l'apoptosi. È stato dimostrato come l'attivazione di EGFR abbia anche un ruolo fondamentale nella trans attivazione di fattori angiogenetici quali VEGF, bFGF e IL-8; interagisce inoltre con componenti della via delle integrine, coinvolte nell'adesione intercellulare, e incrementa l'attivazione delle metallo proteinasi di matrice [Hirsch *et al.*, 2003; Rosanda *et al.*, 2008].

La sovraespressione di EGFR e dei ligandi EGF e TGF α è ben documentata nell'uomo in diversi tumori solidi di origine epiteliale e, nello specifico, in carcinoma ovarico, mammario, uroteliale, cervicale, squamocellulare cervicofacciale, esofageo, colorettales, gastrico, polmonare non microcitico ed endometriale [Nicholson *et al.*, 2001; Dei Tos e Ellis, 2005]. Tra questi, EGFR è riconosciuto come indicatore prognostico negativo in particolare in HNSCC, carcinoma ovarico, cervicale, esofageo e uroteliale [Nicholson *et al.*, 2001; Arteaga, 2003; Dei Tos e Ellis, 2005; Lurje e Lenz, 2009]. Inoltre, la mancanza di un preciso ruolo fisiologico di EGFR nella vita adulta lo rende un *target* terapeutico ideale. Inibitori di EGFR sono stati valutati sia come agenti singoli che nell'ambito di terapie multimodali e in caso di resistenza ad altri trattamenti. Le cellule neoplastiche che sopravvivono alla radioterapia frazionata tendono infatti a sovraesprimere sia EGFR che TGF α , a suggerire che la disregolazione di EGFR possa rappresentare un importante meccanismo attraverso il quale le cellule cancerose attenuano gli effetti citotossici della radioterapia [Thariat *et al.*, 2007]. In particolare nel HNSCC si è visto come l'espressione di EGFR aumenti in modo proporzionale alla resistenza alla radioterapia e come l'impiego combinato di radioterapia e *cetuximab* si traduca in un maggiore controllo loco-regionale e in una ridotta mortalità [Bonner *et al.*, 2006; Thariat *et al.*, 2007]. Gli EGFR-inibitori sono stati utilizzati anche in combinazione con la chemioterapia con buoni risultati nei HNSCC e con risultati variabili nei NSCLC [Baselga *et al.*, 2005; Mok *et al.*, 2009]. Gli sforzi in medicina umana sono quindi al momento incentrati sull'identificazione di *marker* predittivi affidabili di risposta alla terapia [Mok *et al.*, 2009; Pircher *et al.*, 2010].

In medicina veterinaria è crescente l'interesse verso EGFR come potenziale indicatore prognostico e possibile *target* terapeutico, e sono stati condotti diversi studi per indagare il ruolo di EGFR nei tumori animali, utilizzando come modello di partenza i tumori dell'uomo in cui sono state dimostrate disregolazioni del recettore.

In ogni caso, ad oggi sono disponibili solo pochi studi sui meccanismi oncogenetici e l'efficacia degli EGFR-inibitori non è ancora stata testata in medicina veterinaria [Bergkvist e Yool, 2011].

Tumori mammari

EGFR è comunemente espresso nei carcinomi mammari dell'uomo e il suo ruolo come *marker* prognostico e predittivo è stato ampiamente studiato in questi tumori, così come quello degli altri recettori appartenenti alla stessa famiglia [Raica *et al.*, 2009; Bergkvist e Yool, 2011]. I risultati ottenuti sono però tutt'altro che univoci: la percentuale riportata di tumori che esprimono EGFR varia infatti dal 14% al 91% a seconda degli studi [Bergkvist e Yool, 2011]. L'ampiezza di questo *range* probabilmente riflette le diverse tecniche di laboratorio utilizzate, che risultano anche per questo difficilmente comparabili. Inoltre alcuni autori riportano una correlazione positiva tra espressione di EGFR e tempi di sopravvivenza, mentre altri una correlazione inversa. L'espressione di EGFR è stata anche messa in relazione a una più elevata attività proliferativa tumorale [Rimawi *et al.*, 2010; Bergkvist e Yool, 2011].

Le neoplasie mammarie del cane e del gatto condividono numerose caratteristiche clinicopatologiche con i tumori dell'uomo e sono stati proposti da diversi autori come modelli di studio comparativi. L'espressione di EGFR è stata dimostrata nella ghiandola mammaria normale del cane ed è stata inoltre valutata nei carcinomi mammari per il suo potenziale ruolo nella classificazione e nella patogenesi della malattia [Minke *et al.*, 1991; Rutteman *et al.*, 1994; Donnay *et al.*, 1996; Matsuyama *et al.*, 2001; Gama *et al.*, 2009; Queiroga *et al.*, 2009]. Proprio come nell'uomo, le differenze nei metodi di valutazione utilizzati hanno portato a risultati discordanti. Rutteman *et al.* (1994) hanno valutato le concentrazioni di EGFR in aliquote di membrane cellulari omogenate ottenute da campioni di tessuto mammario neoplastico e non neoplastico di cane mediante saggi di *binding* con radioligandi. In questo studio non è stata evidenziata alcuna correlazione tra le concentrazioni di EGFR e le dimensioni del tumore, l'interessamento dei linfonodi regionali, la diffusione metastatica o l'istotipo tumorale, e gli autori hanno concluso che l'espressione di EGFR non fosse associata con il comportamento biologico dei tumori mammari di cane. In alcuni tipi di neoplasie, EGFR si localizza anche a livello citoplasmatico o nucleare. In particolare, l'espressione nucleare sarebbe correlata alla resistenza a terapie con EGFR inibitori. Nello studio di Donnay *et al.* (1996), EGFR era espresso nel 69% delle neoplasie mammarie del cane, ma senza differenze significative rispetto ai tessuti non neoplastici. In uno studio più recente, invece, è riportata una percentuale significativamente più elevata di cellule esprimenti EGFR nei tumori mammari maligni rispetto a quelli benigni e si osserva una correlazione tra espressione di EGFR ed età dei pazienti e stadio tumorale [Gama *et al.*, 2009]. Nonostante i dati non siano statisticamente significativi, è stata identificata una tendenza a una riduzione dell'intervallo libero da malattia e dei tempi di sopravvivenza nei pazienti con tumori maligni che

sovraesprimono EGFR, ipotizzando un ruolo prognostico del recettore [Gama *et al.*, 2009].

Sempre nel cane, altri studi hanno valutato la concomitante espressione di EGFR e del proprio ligando EGF [Queiroga *et al.*, 2009]. I livelli di EGF sono risultati più elevati nei tumori mammari maligni e, tra questi, nel carcinoma infiammatorio. La sovraespressione di EGF era inoltre correlata a caratteristiche clinico-patologiche quali la dimensione dei tumori, il ritmo di crescita, l'ulcerazione e l'adesione ai tessuti sottostanti [Queiroga *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2011].

Il ruolo degli steroidi sessuali nella patogenesi e nel trattamento delle neoplasie mammarie sono argomenti di ricerca emergenti in medicina umana. L'espressione di EGFR, ErbB2 e dei recettori per estrogeni (ER) e progesterone assieme ad altri *marker* come le citocheratine è stata utilizzata per caratterizzare i tumori mammari in sottotipi [O'Brien *et al.*, 2009; Rimawi *et al.*, 2010]. L'espressione di EGFR è stata associata a tumori che presentano una ridotta espressione di recettori per estrogeni e progesterone e un'elevata espressione di ErbB2, un profilo correlato a un comportamento biologico più aggressivo. L'attivazione di EGFR è considerata uno dei meccanismi che conferiscono alle cellule tumorali la capacità di evadere alle terapie ormonali anti-estrogeni e potrebbe giustificare la correlazione inversa tra EGFR e recettori per gli steroidi sessuali comunemente evidenziata nei tumori mammari [O'Brien *et al.*, 2009; Rimawi *et al.*, 2010]. I recettori per progesterone ed estrogeni sono espressi anche nei tumori mammari del cane e sembrano avere un ruolo nella patogenesi della malattia, tuttavia, a differenza dell'uomo, l'espressione di EGFR e dei recettori per gli steroidi sessuali sembrano essere positivamente correlati nei tumori mammari maligni del cane [Nerurkar *et al.*, 1987; Rutteman *et al.*, 1994; Donnay *et al.*, 1996].

Nel gatto l'espressione di EGFR è stata valutata in linee cellulari di carcinomi mammari xenotrapiantate [Minke *et al.*, 1991]. Questo studio ha dimostrato che una sottopopolazione di cellule carcinomatose aveva una maggiore malignità, che era correlata a una più elevata espressione di EGFR funzionalmente attivo in associazione ad amplificazione genica del recettore [Minke *et al.*, 1991]. Questo studio fornisce ulteriori elementi per ipotizzare un ruolo oncogenico di EGFR, ma la disregolazione di EGFR nei carcinomi mammari del gatto non è ancora stata dimostrata *in vivo*.

Carcinoma squamocellulare

Il carcinoma squamocellulare del distretto cervico-facciale rappresenta più del 90% dei tumori maligni del tratto aerodigestivo superiore nell'uomo [Reuter *et al.*, 2007]. La malattia è localmente aggressiva, con elevata incidenza di recidive e nuove insorgenze e rapida diffusione ai linfonodi regionali. Una sovraespressione di EGFR è presente nell'80-90% degli HNSCC e rappresenta un fattore prognostico negativo [Harari, 2004; Dei Tos e Ellis, 2005].

Il carcinoma squamocellulare (SCC) rappresenta la maggioranza delle neopla-

sie del cavo orale nel gatto. Come il HNSCC, anche il SCC orale felino è caratterizzato da una spiccata aggressività locale e da una prognosi nella maggior parte dei casi sfavorevole (sopravvivenza a un anno in meno del 10% dei casi), nonostante la metastatizzazione tardiva [Stebbins *et al.*, 1989; Hayes *et al.*, 2007]. Valutazioni di tipo comparativo possono pertanto rivelarsi utili nello studio della patogenesi e della gestione della malattia.

Tra i diversi fattori di rischio identificati per lo sviluppo dell'HNSCC sono compresi l'esposizione a fumo di tabacco e l'inquinamento atmosferico. Studi analoghi condotti nel gatto hanno evidenziato un'associazione tra inquinanti ambientali e SCC, nonostante non sia stata raggiunta una significatività statistica. L'espressione immunoistochimica di EGFR nel SCC orale del gatto è stata valutata in due studi e riportata in 9 di 13 (69%) e in 67 di 67 (100%) casi, rispettivamente [Looper *et al.*, 2006; Bergkvist *et al.*, 2011]. Il segnale era prevalentemente di membrana, associato a una più lieve positività citoplasmatica in una parte dei campioni. Nel secondo studio è stata osservata una tendenza non statisticamente significativa a una sopravvivenza maggiore nel gruppo che presentava una percentuale di cellule EGFR positive superiore al 50%. L'espressione di EGFR non era correlata all'attività proliferativa (MIB-1 *index*), che è invece risultata significativamente associata alla prognosi [Bergkvist *et al.*, 2011].

Tumori del SNC

Nei tumori gliali dell'uomo, la sovraespressione di EGFR è osservata più frequentemente negli astrocitomi ad alto grado e negli oligodendrogliomi [Wikstrand e Bigner, 2008]. Nel 30-40% dei casi di glioblastoma multiforme (GBM) è inoltre riportata amplificazione genica di EGFR e fino al 60% presentano sovraespressione immunoistochimica [Gan *et al.*, 2009]. Nel cane i tumori gliali rappresentano il 20% delle neoplasie del SNC e i GBM condividono numerosi aspetti macroscopici, microscopici e immunoistochimici con quelli dell'uomo [Dickinson *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2010]. L'espressione di EGFR nei GBM del cane è stata riportata inizialmente in tre di cinque casi [Lipsitz *et al.*, 2003]. Un più ampio studio immunoistochimico condotto su 31 astrocitomi di cane ha dimostrato l'espressione di EGFR in un quarto dei campioni, che comprendevano sia astrocitomi a basso grado che GBM [Stoica *et al.*, 2004]. In uno studio recente è stata valutata l'espressione immunoistochimica di diversi recettori di fattori di crescita su *microarray* tissutali ottenuti da 57 tumori gliali e si è visto come l'espressione di EGFR tendesse ad aumentare negli astrocitomi ad alto grado [Higgins *et al.*, 2010].

I livelli di amplificazione genica valutati mediante *real time* PCR in 66 tumori cerebrali di vari tipi istologici sono risultati più elevati rispetto all'espressione della proteina, a suggerire una regolazione post-transcrizionale di EGFR nei tumori cerebrali [Dickinson *et al.*, 2006]. L'amplificazione genica, responsabile di una sovraespressione proteica, è la più comune disregolazione di EGFR nei tumori del SNC

dell'uomo, evidenziata nel 40% circa dei GBM. Tra i due-terzi e i tre-quarti dei tumori con amplificazione di EGFR presentano inoltre mutazioni geniche, la più comune delle quali è EGFRvIII [Gan *et al.*, 2009]. Thomas *et al.* (2009) hanno effettuato un'analisi di ibridazione genomica comparativa su 60 tumori primitivi del SNC che comprendevano 35 meningiomi e 25 gliomi, rilevando un'amplificazione genica di EGFR in due di due GBM e in due gliomi misti di grado II. Hanno inoltre identificato in una parte dei tumori alcune alterazioni geniche che potrebbero essere responsabili dell'amplificazione. Gli autori ipotizzano pertanto un coinvolgimento di EGFR nell'oncogenesi di alcuni tumori cerebrali primitivi del cane e propongono EGFR come *marker* per l'identificazione delle neoplasie a comportamento biologico più aggressivo [Thomas *et al.*, 2009].

Carcinoma epatocellulare

EGFR e i suoi ligandi EGF e TGF α sono ampiamente espressi nel carcinoma epatocellulare (HCC) dell'uomo, dove le vie di segnalazione EGFR-mediate sono considerate un importante *pathway* mitogenico [Furuse, 2008]. Le terapie con EGFR-inibitori hanno effetti misurabili ma modesti nel controllo di questa neoplasia e l'espressione di EGFR non sembra avere un significativo valore prognostico [Philip *et al.*, 2005].

Un piccolo studio preliminare condotto su HCC di cane ha dimostrato l'espressione di EGFR in una parte dei casi [Grabarevic *et al.*, 2009]. Occorre tuttavia considerare che l'eziopatogenesi dell'HCC nell'uomo e nel cane appare diversa. Nell'uomo la presenza di malattie epatiche pregresse, come la cirrosi o l'epatite, sono considerati importanti fattori predisponenti, mentre nel cane l'HCC sembra svilupparsi in assenza di altre malattie epatiche [Berasain *et al.*, 2009; Grabarevic *et al.*, 2009]. Quindi, a differenza dell'uomo, la disregolazione dell'espressione di EGFR potenzialmente scatenata da fenomeni infiammatori non sembra possa contribuire allo sviluppo del HCC nel cane.

Carcinoma nasale

Nell'uomo, EGFR è sovraespresso in più del 70% dei carcinomi nasofaringei [Pan *et al.*, 2008]. I tumori epiteliali nasali del cane sono stati valutati per l'espressione di EGFR in un solo studio, che ha evidenziato una positività in 13 di 24 casi (54%). Gli autori hanno pertanto ipotizzato un'utilità dell'impiego di terapie anti-EGFR nei carcinomi nasali del cane per potenziare l'efficacia dei trattamenti attualmente impiegati, ad esempio aumentando la radiosensibilità dei tumori [Shiomitsu *et al.*, 2009].

Tumori polmonari

Il TKI *erlotinib* migliora l'intervallo libero da progressione e la sopravvivenza nei pazienti con NSCLC che hanno sviluppato chemioresistenza. I livelli di espressione di EGFR, le mutazioni e il numero di copie geniche hanno pertanto un'utilità nel predi-

re la risposta a terapie EGFR-mediate [Burris, 2009; Hirsch *et al.*, 2009]. Uno studio ha valutato nel cane l'espressione di EGFR in una serie di tumori polmonari spontanei e plutonio-indotti e in tessuto polmonare non neoplastico. EGFR non era espresso nel parenchima polmonare indenne, mentre è stato identificato in 17 di 36 (47%) tumori (sia spontanei che indotti) e in particolare nei carcinomi epidermoidi. Gli autori hanno quindi ipotizzato che la sovraespressione di EGFR possa essere un evento tardivo nello sviluppo dei tumori polmonari nel cane, dal momento che la maggior parte dei foci di lesioni preneoplastiche adiacenti ai tumori non esprimevano il recettore [Gillett *et al.*, 1992].

Mutazioni a livello del dominio tirosinchinasico di EGFR sono state valutate con esito negativo in una serie di ovini con adenocarcinoma polmonare, un tumore associato all'infezione del virus della *Jaagsiekte* [Hudachek *et al.*, 2010].

Osteosarcoma

McCleese *et al.* (2011) hanno dimostrato una coespressione dei RTK EGFR e *Ron* in campioni tissutali e linee cellulari di osteosarcoma di cane. Entrambi i recettori erano presenti in uno stato fosforilato nel tessuto tumorale e, nelle linee cellulari, l'espressione di *Met* era associata a quella di EGFR e *Ron*. L'interferenza (*cross-talk*) tra RTK di famiglie diverse è riportata in medicina umana [Lai *et al.*, 2009; Dulak *et al.*, 2011]. *Met*, *Ron* e EGFR utilizzano alcune vie di segnalazione comuni, come PI3K-AKT e ERK1/2-MAPK. Questa interferenza potrebbe garantire la possibilità di una compensazione del segnale in caso di inibizione di uno dei recettori o un potenziamento del segnale in caso di attivazione multipla o simultanea [McCleese *et al.*, 2011].

HER2/neu

La sovraespressione di HER2 indotta da amplificazione genica è presente nel 25-30% delle neoplasie mammarie della donna ed è associata ad aumentato potenziale metastatico, ridotto intervallo libero da malattia e diminuzione dei tempi di sopravvivenza [Kaya *et al.*, 2001; Slamon *et al.*, 1987; Barnes, 1993].

Nel cane, una sovraespressione immunoistochimica di HER2 è stata osservata in una percentuale di tumori mammari compresa tra il 17.6% e il 31.6% [Rungsipipat *et al.*, 1999; Martin de las Mulas *et al.*, 2003], mentre elevati livelli di mRNA della proteina sono stati evidenziati in 0 di 5 tumori mammari benigni e in 17 di 23 tumori maligni [Ahern *et al.*, 1996].

In alcuni studi è proposta una classificazione molecolare dei carcinomi mammari del cane sulla base della positività immunoistochimica a HER2, ai recettori per gli estrogeni e il progesterone e ai *marker* delle cellule basali (citocheratina 5/6, p63, caderina P), come in medicina umana [Gama *et al.*, 2008; Sassi *et al.*, 2010]. Secondo questa classificazione sono identificati quattro diversi sottotipi: *luminale A* (ER+/PR+/HER2-), *luminale B* (ER+/PR+/HER2+), *basale* (ER-/HER2-/positivi a un

marker delle cellule basali) e con sovraespressione di HER2 (ER-/PR-/HER2+). Nello studio di Gama *et al.* (2008) i tumori appartenenti al sottotipo luminale A erano caratterizzati da basso grado istologico e ridotta attività proliferativa, mentre quelli di tipo basale erano in genere ad alto grado, ad elevata attività proliferativa e, come nell'uomo, significativamente associati a una prognosi sfavorevole.

L'espressione di HER2 è stata inoltre dimostrata mediante RT-PCR in 4 di 10 (40%) campioni tissutali e in 6 di 7 (86%) linee cellulari di osteosarcoma di cane [Flint *et al.*, 2004].

Nel gatto l'espressione di HER2 è stata osservata in linee cellulari di carcinoma mammario [Modiano *et al.*, 1991] e in 28 di 47 campioni tissutali di carcinoma mammario (59.6%) [Millanta *et al.*, 2005]. In quest'ultimo studio, i tumori EGFR-positivi erano associati a una riduzione dei tempi di sopravvivenza, mentre non è stata evidenziata alcuna correlazione con l'istotipo, il grado istologico o la presenza di invasione linfatica. In uno studio di Winston *et al.* (2005) la percentuale di carcinomi mammari felini sovraesprimenti HER2 era del 76.7-90%. In tutti gli studi di immunohistochimica, la positività per HER2 è stata valutata in modo semiquantitativo utilizzando il sistema di *scoring* approvato dalla FDA [Jacobs *et al.*, 1999].

De Maria *et al.* (2005) dimostrano come il dominio tirosinchinasico dell'HER2 felino conservi il 92% di omologia rispetto a quello umano. Nello stesso studio l'mRNA di HER2 è risultato aumentato da 3 a 18 volte in 3 di 3 linee cellulari di carcinoma mammario felino, in uno di 4 adenomi mammari e in 6 di 11 carcinomi. Mediante analisi immunohistochimica, un anticorpo anti-HER2 umano ha marcato positivamente 13 di 36 (36%) campioni istologici di carcinoma mammario felino. Dati il grado di omologia dei geni HER2 umano e felino e la frequente sovraespressione nei tumori mammari in entrambe le specie, il gatto è proposto dagli autori come modello di studio comparativo.

Stoica *et al.* (2001) riportano infine la presenza di una mutazione puntiforme nel gene *neu* che codifica HER2 in 6 tumori maligni delle guaine dei nervi in 3 cavalli, un bovino, un cane e un gatto.

3.2 Recettori dell'insulina

Il recettore insulinico (InsR) e il recettore per il fattore di crescita simil-insulinico 1 (IGF1R) sono recettori tirosinchinasici implicati nella regolazione della crescita e del metabolismo [Stewart e Rotwein, 1996; Bartke, 2005]. Alla stessa classe appartiene anche IGF2R, che però non è un recettore tirosinchinasico [Kornfeld, 1992]. I ligandi sono insulina, IGF1 e IGF2, che hanno una più elevata affinità per il loro recettore specifico, ma possono legarsi anche agli altri due [Ward e Lawrence, 2009]. Negli ul-

timi anni, un aumento del rischio di sviluppare tumori, tra cui neoplasie mammarie, è stato associato nell'uomo al trattamento con insulina *glargine*, un analogo dell'insulina ad elevata affinità per IGF1R [Smith e Gale, 2009]. In generale l'iperinsulinemia è considerata un fattore di rischio per alcuni tipi di tumori; i precisi meccanismi molecolari alla base del suo effetto cancerogenetico non sono noti, ma una delle possibili cause è l'amplificazione delle vie del segnale attraverso InsR, IGF1R o eterodimeri di entrambi i recettori [Frasca *et al.*, 2008]. Oltre all'insulina, anche aumentati livelli di IGF1 sembrano implicati nella cancerogenesi mammaria e nei tumori mammari dell'uomo è descritta la sovraespressione di IGF1R [Resnik *et al.*, 1998; Belfiore e Frasca, 2008]. L'impatto di IGF1 e del suo recettore nella cancerogenesi mammaria è stata testata sperimentalmente nel topo transgenico, dove la sovraespressione di IGF1R costitutivamente attivato stimolava la proliferazione del tessuto mammario [Carboni *et al.*, 2005].

Un recente studio condotto nel cane ha evidenziato una forte espressione di InsR nel tessuto mammario normale e negli adenomi, mentre i carcinomi primari e metastatici presentavano un'espressione significativamente più ridotta. Per quanto riguarda invece IGF1R non sono state osservate differenze tra tessuto neoplastico e non neoplastico. Per cui il ruolo dei recettori per l'insulina negli stadi più avanzati della cancerogenesi mammaria sembrerebbe essere limitato nel cane [Klopfleisch *et al.*, 2010].

IGF1R è risultato anche significativamente sovraespresso nei tumori delle cellule interstiziali e nei tumori misti del testicolo del cane [Peters *et al.*, 2003].

3.3 Recettori del fattore di crescita di derivazione piastrinica

PDGFR

Le vie di segnalazione mediate da PDGFR sono deputate alla differenziazione, maturazione e proliferazione di numerose cellule di origine mesenchimale, tra cui fibroblasti, periciti e cellule gliali e regolano l'aggregazione piastrinica nei processi di riparazione tissutale. Sono stati descritti due diversi tipi di recettore, *alpha* e *beta*, che possono legarsi a cinque diverse isoforme di PDGF (-AA, -BB, -AB, -CC, -DD). PDGFR risulta disregolato in diverse neoplasie dell'uomo, tra cui tumori gliali e carcinomi ovarici e GIST [Halper, 2010; Morris e Abrey, 2010].

Sono ancora pochi gli studi che hanno valutato l'espressione di PDGFR nelle neoplasie dei nostri animali. È probabile che, almeno in alcuni casi, si verifichino delle interazioni tra PDGFR e altre oncoproteine. Ad esempio, l'oncoproteina E5 del papilloma virus bovino è implicata assieme a PDGFR β nella patogenesi dei tumori della ve-

scica nel bovino e del sarcoide equino [Borzacchiello *et al.*, 2006; Borzacchiello *et al.*, 2009].

Nei tumori cerebrali del cane, l'espressione immunohistochimica di PDGFR α è stata evidenziata nel 43% dei glioblastomi, nel 34% degli astrocitomi e nel 94% degli oligodendrogliomi di grado III [Higgins *et al.*, 2009]. Un altro studio che ha valutato livelli di mRNA riporta invece un'espressione limitata agli oligodendrogliomi [Dickinson *et al.*, 2006]. Uno studio di Brown *et al.* (2011) su 77 adenocarcinomi delle ghiandole apocrine dei sacchi anali del cane riporta una positività immunohistochimica per PDGFR β nel 19% dei casi. Nella maggior parte dei tumori la percentuale di cellule positive era comunque piuttosto bassa (5-20%). In ogni caso, data l'assenza totale di espressione di PDGFR β nell'epitelio normale dei sacchi anali, è ipotizzato un ruolo del recettore nello sviluppo e progressione di questi tumori, e una possibile risposta al trattamento con *toceranib*. L'espressione di PDGFR β è riportata inoltre nell'emangiosarcoma del cane [Tamburini *et al.*, 2010]. Uno studio recentemente condotto da Gregory-Bryson *et al.* (2010) su 17 GIST di cane non ha evidenziato mutazioni a carico degli esoni 12, 14 e 18 di PDGFR α .

Nel gatto, studi immunohistochimici hanno dimostrato l'espressione di PDGFR nel sarcoma iniettivo (ISS), mentre i fibrosarcomi non iniezione-indotti sarebbero negativi o solo debolmente positivi [Hendrick *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 2011]. Studi *in vitro* indicano che la disregolazione di PDGFR contribuisce alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule del sarcoma iniettivo e l'inibizione delle vie del segnale PDGFR-mediato con *imatinib mesilato* o *masitinib*, riduce la proliferazione delle cellule del ISS in modo proporzionale alla dose [Katayama *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2011]. Questo, data anche l'espressione di *Kit* in un certo numero di ISS, suggerisce l'impiego dei TKI come terapia adiuvante nel trattamento di questo tumore [Smith *et al.*, 2009].

Kit

Kit è un recettore tirosinchinasico codificato dal proto-oncogene *c-Kit*, l'interazione tra *Kit* e il suo ligando specifico SCF (*stem cell factor* o fattore di crescita mastocitario), prodotto da fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali e cellule stromali del midollo osseo, regola sopravvivenza, proliferazione e differenziazione cellulare dei mastociti. *Kit* è inoltre implicato nel processo di differenziazione maturativa delle cellule staminali totipotenti e gioca un ruolo essenziale nello sviluppo fetale. La sua espressione nella vita postnatale è mantenuta essenzialmente da cellule staminali emopoietiche, mastociti, cellule germinali, melanociti e cellule intersiziali di *Cajal* [Webster *et al.*, 2006]. *Kit* è implicato nella patogenesi di numerosi tumori dell'uomo, tra cui tumori gastrointestinali stromali, mastocitosi sistemica, carcinomi polmonari microcistici, tumori testicolari, carcinomi prostatici e leucemia mieloblastica acuta [Webster *et al.*, 2006].

Kit è il RTK più estesamente studiato e caratterizzato nelle neoplasie dei pic-

coli animali, in particolare nel mastocitoma, ed è al momento l'unico per il quale esistono trattamenti terapeutici mirati specifici in medicina veterinaria.

Tumori gastrointestinali stromali

I tumori gastrointestinali stromali sono caratterizzati da un comportamento biologico estremamente aggressivo e da una prognosi spesso sfavorevole. Nell'uomo circa il 70% dei GIST insorge a livello gastrico e il 20% a carico del piccolo intestino, mentre nel cane accade il contrario (19% a livello gastrico e 76% a livello intestinale) [Gregory-Bryson *et al.*, 2011]. È stato ipotizzato che i GIST derivino dalla trasformazione neoplastica delle *cellule interstiziali di Cajal*, cellule *pacemaker* responsabili della regolazione dell'attività peristaltica gastrointestinale. Le cellule di Cajal esprimono fisiologicamente *Kit* e tale espressione è mantenuta anche nella maggioranza dei GIST, che sono in genere differenziati da altri tumori mesenchimali proprio grazie alla positività immunoistochimica per *Kit*. Mutazioni di *c-Kit* sono presenti in più del 65% dei GIST dell'uomo e, nei rimanenti casi, circa il 35% presenta mutazioni di PDGFR α . Il 90% delle mutazioni di *c-Kit* sono localizzate a livello di esone 11, che codifica per il dominio juxtamembrana della proteina, deputato alla modulazione dell'attività enzimatica, ed è stato dimostrato che mutazioni a questo livello determinano un'attivazione costitutiva del recettore [Gregory-Bryson *et al.*, 2011].

L'espressione di *Kit* nei GIST del cane è stata dimostrata in diversi studi [Frost *et al.*, 2003; Bettini *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2003]. La presenza di mutazioni a livello di esone 11 è riportata in 2 di 4 casi e in 6 di 16, mentre non sono state finora evidenziate mutazioni a carico degli esoni 8, 9, 13 e 17 [Frost *et al.*, 2003; Gregory-Bryson *et al.*, 2011].

Mastocitoma

Nei mastociti, *Kit* e il suo ligando SCF sono coinvolti nella sopravvivenza cellulare, proliferazione, differenziazione, chemiotassi, degranolazione e adesione alla fibronectina. *c-Kit* è stato correlato alla patogenesi del mastocitoma cutaneo canino. Più nello specifico, *internal tandem duplication*, delezioni e mutazioni puntiformi prevalentemente a carico del dominio juxtamembrana della proteina (esone 11) sono riportate nel 9-50% dei mastocitomi cutanei del cane e sarebbero direttamente implicate nella patogenesi del processo neoplastico [Zemke *et al.*, 2002; Downing *et al.*, 2002]. Tali mutazioni indurrebbero infatti un'acquisizione di funzione a carico del gene, determinando un'alterazione del recettore, il quale sarebbe sottoposto a una fosforilazione costitutiva in assenza di ligando, cui farebbe seguito una persistente attivazione [London *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999]. Sempre nel cane è stata dimostrata una correlazione statisticamente significativa tra mutazioni, grado istologico elevato e prognosi sfavorevole [Zemke *et al.*, 2002].

L'evidenziazione immunoistochimica del recettore *Kit* permette di rilevare nei mastocitomi di cane tre diversi pattern di espressione: un'espressione limitata alla

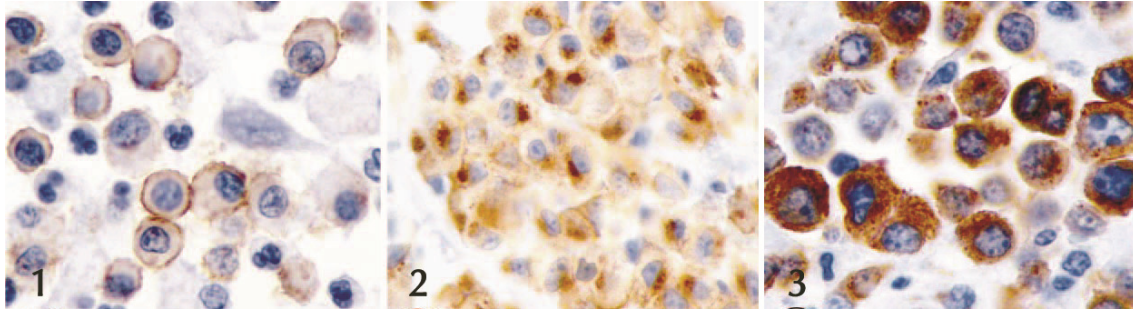


Figura 3.1 *Pattern immunoistochimici del mastocitoma canino (da Webster et al., 2004). 1. Kit-pattern I, caratterizzato da una positività di membrana con assente o moderata positività citoplasmatica dei mastociti neoplastici. 2. Kit-pattern II, caratterizzato da una intensa positività a spot paranucleari dei mastociti neoplastici. 3. Kit-pattern III, caratterizzato da una intensa positività citoplasmatica diffusa dei mastociti neoplastici.*

membrana citoplasmatica analoga a quella presente nei mastociti normali (*Kit-pattern I*); un'espressione citoplasmatica a spot paranucleari (*Kit-pattern II*) e un'espressione citoplasmatica diffusa (*Kit-pattern III*) (**Figura 3.1**) [Webster *et al.*, 2004]. La localizzazione citoplasmatica aberrante di *Kit* (*pattern II* e *III*) è stata associata alla presenza di ITD di *c-Kit* con una frequenza 5 volte maggiore rispetto ai mastocitomi privi di mutazioni ed è correlata a una prognosi peggiore rispetto alla normale localizzazione di membrana, con tasso di recidiva superiore e tempi di sopravvivenza inferiori [Webster *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2007], oltre che a un grado istologico più elevato [Giantin *et al.*, 2012]. Uno studio successivo di Letard *et al.* (2008) segnala la presenza nel 9% dei MCT anche di mutazioni a livello di esoni 8 e 9 di *c-Kit*, codificanti il quinto dominio simil-immunoglobulinico del recettore.

Nel MCT sottocutaneo del cane, un'espressione immunoistochimica aberrante di *Kit* è riportata nel 65% dei casi e, in uno studio, MCT con *Kit-pattern III* erano significativamente associati a un maggior rischio di recidiva locale rispetto ai casi con *Kit-pattern I*. Nessuno dei 60 casi valutati presentava invece mutazioni a carico dell'esone 11 di *c-Kit* [Thompson *et al.*, 2011].

Il mastocitoma del cane rappresenta al momento l'unico caso in medicina veterinaria per il quale siano stati effettuati *trial* terapeutici controllati che abbiano dimostrato l'efficacia del trattamento con TKI (**Paragrafo 3.6**). Nei soggetti con disregolazioni di *Kit* (localizzazione aberrante e/o mutazioni di *c-Kit*) è infatti indicata la terapia con inibitori specifici come *masitinib* e *toceranib* [London, 2009].

Si ritiene che anche il mastocitoma felino abbia un meccanismo patogenetico simile a quello del cane, ma sono pochi per ora gli studi pubblicati riguardo le mutazioni di *c-Kit* nel gatto. Dank *et al.* (2002) hanno effettuato uno studio su 10 campioni di mastocitoma splenico ricercando le medesime mutazioni di *cKit* osservate nei pazienti umani (esone 17) e nei cani (esoni 11 e 12) affetti da MCT. Non rilevando alcun tipo di ITD, si è concluso che la disregolazione di *Kit* attraverso mutazioni at-

tivanti fosse poco probabile in questa specie. Successivamente Isotani *et al.* (2006) hanno analizzato la sequenza nucleotidica del *c-Kit* in un gatto con mastocitosi sistemica e mastocitemia, identificando la presenza di una ITD di 12 paia di basi nella regione corrispondente all'esone 8, che codifica per la quinta spirale immunoglobulino-simile (IgD) del dominio extracellulare. Nel medesimo studio si dimostra inoltre che anche tale mutazione, come accade nel cane, è responsabile di una attivazione della proteina svincolata dalla presenza del ligando, e che quindi poteva contribuire alla trasformazione neoplastica dei mastociti [Isotani *et al.*, 2006]. Nel 2009, Hadzijasufovic *et al.* hanno testato gli effetti di quattro TKI sulla crescita di linee cellulari ottenute da 3 mastocitomi splenici. Tutti hanno determinato una significativa inibizione della crescita e in tutti e 3 i casi era presente una ITD a livello di esone 8 identica a quella precedentemente descritta e fu dimostrata l'espressione di *Kit* da parte delle cellule neoplastiche. Lo stesso anno, un ampio studio ha identificato mutazioni di *c-Kit* in 42 di 62 MCT felini (68%), la maggior parte delle quali era concentrata a livello di quinto dominio *simil-immunoglobulinico* (esoni 8 e 9). Il *pattern* mutazionale descritto nel gatto si allontana da quello generalmente riscontrato nel MCT del cane, in cui il quinto IgD è interessato solo nel 9% dei casi, e nella mastocitosi sistemica dell'uomo, in cui la mutazione prevalente è *c.7176A>T (p.816D>V)*, a livello di esone 17 [Garcia-Montero *et al.*, 2006] ed è invece più simile a quello osservato nella mastocitosi infantile, anche se in quest'ultima la frequenza è inferiore [Lanternier *et al.*, 2008].

L'espressione immunoistochimica di *Kit* è stata recentemente valutata in 27 casi di mastocitoma cutaneo di gatto. L'immunoreattività venne descritta in base alla distribuzione delle cellule positive nel tumore (focale o diffusa), alla localizzazione nella cellula (*Kit pattern* I, II e III) e all'intensità (debole, moderata o forte). Nel complesso, il 92% (25 di 27) dei tumori risultarono positivi, di cui il 72% con espressione aberrante ($n = 18$), in assenza però di una correlazione con il tipo istologico. [Rodriguez-Cariño *et al.*, 2009].

In alcuni studi è stata inoltre effettuata una valutazione dell'espressione e della fosforilazione di *Kit* nei mastociti neoplastici mediante citometria a flusso, *Western blot* e immunoprecipitazione, dimostrando l'attivazione ligando-indipendente di *Kit* [Hadzijasufovic *et al.*, 2009; Isotani *et al.* 2010].

La rilevanza di questi dati suggerisce l'opportunità di ulteriori ricerche per valutare le implicazioni prognostiche dell'anomala espressione di CD117 nel MCT felino e la potenziale compresenza di mutazioni attivanti il proto-oncogene *c-Kit* che possano motivare anche nel gatto l'impiego di terapie a bersaglio molecolare.

Emangiosarcoma

In medicina umana, l'espressione di *Kit* è presente in più del 50% degli angiosarcomi, a fronte di una costante negatività della controparte benigna. Tale espressione sembrerebbe legata a un fenotipo immaturo delle cellule neoplastiche, dal momento

che non è stata individuata alcuna mutazione genomica [Miettinen *et al.*, 2000].

Studi analoghi in medicina veterinaria hanno evidenziato l'espressione di *Kit* anche nell'emangiosarcoma (HSA) del cane; in particolare Fosmire *et al.* (2004) riportano una positività selettiva limitata ai tumori vascolari maligni e Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) dimostrano tramite analisi citofluorimetrica l'espressione di *Kit* (e di altre proteine di superficie proprie delle cellule staminali multipotenti) in linee cellulari di HSA. L'immunoreattività delle cellule dell'emangiosarcoma nei confronti di *Kit* prospetta nuove importanti ipotesi in campo eziopatogenetico. Una delle possibili spiegazioni alla presunta "insorgenza multicentrica" dell'emangiosarcoma, prevede infatti l'origine della neoplasia dai precursori delle cellule endoteliali (EPC) nel midollo osseo. Il mantenimento da parte delle cellule neoplastiche dell'espressione immunoistochimica del recettore per SCF, prerogativa esclusiva degli angioblasti che si perde nel corso dei processi maturativi e viene a mancare nelle cellule endoteliali adulte, sembrerebbe suffragare questa teoria. L'emangioma al contrario, *Kit*-negativo, avrebbe origine da cellule endoteliali mature attraverso meccanismi completamente distinti e non rappresenterebbe dunque una base per lo sviluppo dell'emangiosarcoma [Fosmire *et al.*, 2004].

In uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca su 40 HSA e 29 HA, è stata evidenziata un'espressione citoplasmatica di *Kit* da lieve a intensa nelle cellule endoteliali nel 76% degli HSA. A conferma della selettività del marcatore nei confronti delle cellule maligne, soltanto in due emangiomi a differenziazione *cavernoso-capillare* le cellule endoteliali tendevano a mostrare un debole segnale di membrana. Le cellule endoteliali di tutte le sezioni di tessuto di granulazione mostravano invece un debole segnale positivo per CD117. Questo riscontro, se da un lato è compatibile con il fenotipo immaturo degli angioblasti, dall'altro rende *Kit* un *marker* non affidabile da un punto di vista diagnostico per differenziare le cellule endoteliali maligne da quelle immature in attiva replicazione coinvolte nei processi di angiogenesi (ematomi, riparazione tissutale, altre neoplasie) [Sabattini e Bettini, 2009].

Neoplasie del testicolo

Kit è essenziale per lo sviluppo maturativo delle cellule germinali. Una volta terminata la migrazione e raggiunto il testicolo embrionale, i precursori delle cellule germinali interagiscono con le cellule di Sertoli, che producono SCF, le quali guidano la loro differenziazione in gonociti. Dopo la pubertà, le interazioni tra SCF e *Kit* promuovono la differenziazione dei gonociti in spermatogoni. *Kit* è inoltre espresso dalle cellule di Leydig che, mediante SCF, sono stimulate dalle cellule di Sertoli a produrre testosterone [Grieco *et al.*, 2009].

In patologia umana, l'espressione immunoistochimica di *Kit* e della *fosfatasi alcalina placentare* (PLAP) sono utilizzate per differenziare i seminomi classici (SE), in genere positivi per entrambi i *marker*, da quelli spermatocitici (SS), che non espri-

mono nessuna delle due molecole. Questo diverso *pattern* immunoistochimico suggerisce che gli SE derivino dalle cellule germinative in stadio precoce di maturazione, mentre gli SS derivino da cellule mature e corrisponde a un diverso comportamento biologico: gli SE sono infatti caratterizzati da una maggiore malignità e tendenza alla metastatizzazione [Grieco *et al.*, 2009].

In medicina veterinaria, l'espressione di *Kit* nel testicolo e nelle neoplasie testicolari è stata caratterizzata in due soli studi. Il primo ha evidenziato una positività del testicolo normale limitata alle cellule di Sertoli, mentre nei tumori, *Kit* era espresso in tutti i casi di seminoma ($n = 20$) e nel 67% dei casi di sertolioma (10 di 15) [Yu *et al.*, 2009]. Nel secondo studio sono risultate positive le cellule di Leydig e gli spermatozoni del testicolo normale, tutti i tumori delle cellule interstiziali ($n = 10$), nessun sertolioma (0 di 10) e il 70% dei seminomi (7 di 10). Seguendo il modello umano, questi ultimi sono stati riclassificati, sulla base dell'espressione di *Kit*, in SE e SS. Tale classificazione necessita di ulteriori studi per stabilire se, come accade nell'uomo, i sottotipi individuati presentano un diverso comportamento biologico [Grieco *et al.*, 2009].

Leucemie

Kit è fisiologicamente presente nei progenitori delle cellule emopoietiche sia della linea linfoide che mieloide, ma la sua espressione/sovraespressione è un evento frequente solo nelle leucemie mieloidi. *Kit* è infatti espresso approssimativamente nel 60% dei pazienti umani affetti da leucemia mieloide acuta (AML), nel 4-9% dei casi in corso di leucemia linfoide acuta (ALL) a cellule T e in meno del 3% dei casi in corso di ALL a cellule B. Nelle AML dell'uomo sono riportate diverse mutazioni puntiformi *missense* di *c-Kit*, più spesso localizzate a livello di esone 17, codoni 816 e 822. Anche il dominio extracellulare è frequentemente mutato, in genere a livello di esone 7. Studi *in vitro* dimostrano che le mutazioni di *c-Kit* sono responsabili di un'attivazione costitutiva del recettore. Mutazioni di *c-Kit* sono riportate anche nella mielodisplasia, nella mielofibrosi e nella leucemia mieloide cronica [Usher *et al.*, 2009].

In uno studio su 57 casi di leucemia canina, sono state identificate quattro mutazioni di *c-Kit* in tre casi di AML, di cui tre a livello di esone 17 e una a livello di esone 11. Nello stesso studio sono inoltre riportate 4 diverse mutazioni di *Flt3* (RTK appartenente alla stessa famiglia di PDGFR e *Kit*) in 4 cani con ALL [Usher *et al.*, 2009].

Melanoma

Fino al 90% dei melanomi orali dell'uomo esprime *Kit* e il 22-16% presenta mutazioni di *c-Kit*, localizzate prevalentemente a livello di esone 11 e, meno frequentemente, di esone 13 [Beadling, 2008; Rivera *et al.*, 2008]. L'espressione di *Kit* tende a diminuire o a perdersi completamente nei tumori in stadio avanzato o metastatici

[Montone, 1997].

Nel cane, uno studio condotto su 39 melanomi orali ha evidenziato una positività immunoistochimica nel 51% di casi (20 di 39), in assenza di una relazione statistica con lo stadio tumorale, la prognosi o la morfologia cellulare. Lo stesso studio non ha evidenziato la presenza di mutazioni di *c-Kit* a carico dell'esone 11 in nessuno dei 17 casi testati [Murakami *et al.*, 2011].

Fibrosarcomi dei tessuti molli

Dodici di 46 fibrosarcomi di gatto (26%) sono risultati immunoreattivi per la proteina *Kit*. La positività era citoplasmatica diffusa ed è stata evidenziata in più dell'80% delle cellule neoplastiche in 4 casi (9%). L'espressione di *Kit* non era associata al grado istologico delle neoplasie, alla prognosi o alle caratteristiche istologiche proprie del c.d. sarcoma iniettivo [Smith *et al.*, 2009].

Altre neoplasie

L'espressione immunoistochimica di *Kit* è riportata in 2 di 77 (2.6%) adenocarcinomi delle ghiandole apocrine dei sacchi anali di cane [Brown *et al.*, 2011], mentre non è stata evidenziata nei gliomi di cane (20 casi negativi su 20) [Jankovsky *et al.*, 2011].

3.4 Recettori del fattore di crescita dell'endotelio dei vasi

Di questa famiglia fanno parte recettori tirosinchinasici coinvolti nella regolazione dei processi di vasculogenesi (VEGFR2 o Flt1) e angiogenesi (VEGFR1 o Flk1 o KDR) e quindi deputati alla proliferazione, migrazione, sopravvivenza e differenziazione delle cellule endoteliali. VEGFR3 è il recettore per i fattori di crescita linfangiogenetici VEGFC e VEGFD. Espresso da tutte le cellule endoteliali durante le prime fasi di sviluppo, la sua produzione diverrebbe in seguito appannaggio esclusivo dei vasi linfatici [Ferrara e Gerber, 2003].

Studi nell'uomo riferiscono l'espressione di questi recettori da parte delle cellule tumorali nell'ambito delle neoplasie vascolari e ne riportano il coinvolgimento nei processi angiogenetici in diverse tipologie di tumori solidi [Laakkonen *et al.*, 2007; Petrova *et al.*, 2008]. Nei tumori dell'uomo in molti casi le cellule tumorali esprimono sia VEGFR che i suoi recettori, avvalendosi in questo modo di un meccanismo autocrino di stimolazione della crescita [Ferrara e Gerber, 2003].

In medicina veterinaria, l'espressione concomitante di VEGF e dei suoi recettori è stata dimostrata in colture cellulari di mastocitoma di cane [Rebuzzi *et al.*, 2007], nel fibrosarcoma del cane [Al-Dissi *et al.*, 2009] e nei tumori mammari del cane e del gatto, con un aumento dell'espressione nelle neoplasie maligne scarsamente

differenziate [Restucci *et al.*, 2004; Millanta *et al.*, 2006; Al-Dissi *et al.*, 2010]. VEGF e VEGFR2 sono inoltre espressi in più del 70% dei SCC e dei tricoepiteliomi di cane. Nei SCC sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative tra i livelli di VEGFR2, grado istologico e attività proliferativa [Al-Dissi *et al.*, 2007].

Da uno studio condotto su 73 emangiosarcomi e 15 emangiomi, emerge come il grado di espressione di VEGFR1 e VEGFR2 sia superiore negli emangiosarcomi rispetto alla controparte benigna, mentre l'espressione del ligando sia da considerarsi pressoché esclusiva delle cellule tumorali maligne, a suggerire un meccanismo di stimolazione autocrina in queste ultime, mentre le cellule dell'emangioma sarebbero dipendenti dal rilascio di VEGF da parte di cellule infiammatorie e stromali. Inoltre, i tumori che esprimono maggiormente VEGFR2 presentano anche una maggiore percentuale di cellule positive al *marker* proliferativo Ki67 [Yonemaru *et al.*, 2006]. Nell'emangiosarcoma del cane è riportata anche l'espressione immunoistochimica di VEGFR3, osservata in 14 di 39 casi (36%), a fronte di una positività significativamente inferiore (7%) della controparte benigna. La debole e incostante espressione del ligando VEGFC sembrerebbe tuttavia escludere in questo caso la presenza di una via di stimolazione autocrina [Sabattini e Bettini, 2009].

Un'aumentata espressione di VEGFR1 e VEGFR2 è riportata anche nei tumori del sistema nervoso centrale dell'uomo, con positività maggiore nei tumori gliali ad alto grado [Hatva *et al.*, 1995; Dickinson *et al.*, 2006]. Nel cane il *pattern* di espressione di VEGFR1 e VEGFR2 è estremamente simile, con espressione maggiore negli oligodendrogliomi di grado III [Dickinson *et al.*, 2006].

3.5 *Met*

L'attivazione delle vie del segnale mediate da *Met* e dal suo ligando, il fattore di crescita epatocitario (HGF), promuove la divisione e la motilità cellulare ed è pertanto implicata nella progressione e metastatizzazione di numerose neoplasie epiteliali e mesenchimali dell'uomo [Birchmeier *et al.*, 2003]. In particolare, sono in continuo aumento gli studi che confermano un'associazione tra disregolazione di *Met* e insorgenza e progressione dell'osteosarcoma [Ferracini *et al.*, 2000; De Maria *et al.*, 2009]. *Met* è sovraespresso nel 70-85% degli osteosarcomi dell'uomo ed è correlato a un aumento del potenziale metastatico e a una prognosi sfavorevole. È stato inoltre dimostrato che la sovraespressione di *Met* è in grado di promuovere la trasformazione neoplastica degli osteoblasti [Ferracini *et al.*, 2000; Coltella *et al.*, 2003; De Maria *et al.*, 2009].

In oncologia veterinaria, la sovraespressione di *Met* è riportata in linee cellulari di osteosarcoma [MacEwen *et al.*, 2003], e un polimorfismo del gene *c-Met* è stato osservato nei Rottweiler, razza predisposta all'insorgenza di questo tumore [Liao

et al., 2006]. Questo ha fatto sì che alcuni autori proponessero l'utilizzo del cane come modello di studio preclinico per l'osteosarcoma dell'uomo [De Maria *et al.*, 2009].

Fieten *et al.* (2009) hanno valutato i livelli di mRNA e il *pattern* di espressione immunoistochimica di *Met* e HGF in 59 campioni di osteosarcoma di cane, riscontrando in tutti i casi la presenza sia del recettore che del ligando, il che permette di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di stimolazione autocrina. Il *pattern* di espressione di *Met* era citoplasmatico e i livelli di positività erano correlati alla presenza di metastasi linfonodali, ma non all'intervallo libero da recidiva o alla sopravvivenza, limitandone l'utilità come fattore prognostico [Fieten *et al.*, 2009].

Di recente, in uno studio di McCleese *et al.* (2011) è stata segnalata la coespressione di *Met* e di *Ron* (recettore appartenente alla stessa famiglia) nell'osteosarcoma del cane, suggerendo la possibilità di una eterodimerizzazione dei due recettori con conseguente amplificazione del segnale. Gli stessi autori hanno osservato inoltre una significativa riduzione della proliferazione cellulare *in vitro* in seguito all'utilizzo di *crizotinib*, un inibitore di *Met* [McCleese *et al.*, 2011].

Un'espressione aberrante di *Met* è riportata inoltre in linee cellulari di mastocitomi, sarcomi istiocitari, emangiosarcomi e melanomi. In alcune di queste linee cellulari era presente coespressione di HGF [Liao *et al.*, 2006]. L'espressione di *Met* nei tumori del sistema nervoso centrale nel cane, valutata mediante quantificazione di mRNA con RT-PCR, è risultata generalmente bassa, ad eccezione degli oligodendrogliomi di grado III [Dickinson *et al.*, 2006]. Uno studio di Neo *et al.* (2005) ha infine evidenziato come i livelli di mRNA di *Met* fossero due volte più elevati nel fegato in rigenerazione rispetto al fegato normale, a indicare che anche nel cane *Met* è attivamente coinvolto nel rimodellamento del tessuto epatico.

3.6 Gli inibitori tirosinchinasici in medicina veterinaria

Esistono dati limitati sull'efficacia delle piccole molecole ad azione inibente in oncologia veterinaria. Questo è dovuto in parte al fatto che i *target* terapeutici non sono ancora ben definiti per la maggior parte dei tumori del cane e del gatto. Inoltre, la maggior parte dei TKI ad uso umano hanno costi proibitivi, che ne limitano fortemente la diffusione in medicina veterinaria [London, 2009]. Di recente, *imatinib* è stato utilizzato anche per il trattamento oncologico del cane e nel gatto e sono stati messi in commercio due TKI ad uso specifico veterinario, *toceranib* e *masitinib* (Tabella 3.2).

Tabella 3.1 Principali disregolazioni dei recettori tirosinchinasici in oncologia veterinaria.

Recettori tirosinchinasici	Meccanismi di disregolazione	Ruolo in oncologia veterinaria
EGFR		
EGFR	Sovraespressione (amplificazione)	Cane: carcinomi mammari, carcinoma squamocellulare, carcinomi nasali, carcinomi polmonari, osteosarcoma, gliomi Gatto: carcinomi mammari, carcinoma squamocellulare
ErbB2/HER2/neu	Sovraespressione (amplificazione)	Cane: carcinomi mammari, osteosarcoma Gatto: carcinomi mammari
	Mutazioni puntiformi	Tumori maligni delle guaine dei nervi (varie specie)
InsR		
IGF1R	Sovraespressione	Cane: mammella e tumori mammari, neoplasie del testicolo
PDGFR		
PDGFRα,	Sovraspressione	Cane: gliomi
PDGFRβ	Interazione con oncoproteine virali	Bovino: tumori della vescica; Cavallo: sarcoide
	Sovraespressione	Cane: emangiosarcoma Gatto: sarcoma iniettivo
	Espressione aberrante	Cane: adenocarcinoma delle ghiandole apocrine dei sacchi anali
Kit	Sovraespressione/mutazioni	Cane: tumori gastrointestinali stromali, leucemia mieloide acuta
	Espressione aberrante/mutazioni	Cane: mastocitoma Gatto: mastocitoma
	Sovraespressione	Cane: neoplasie del testicolo, emangiosarcoma, melanoma orale Gatto: fibrosarcoma
Flt3/Flk2	Mutazioni	Cane: leucemia linfoide acuta
VEGFR		
VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR	Espressione	Angiogenesi tumorale
	Stimolazione autocrina	Cane: mastocitoma (linee cellulari), tumori mammari, carcinoma squamocellulare, tricoepitelioma, fibrosarcoma, emangiosarcoma Gatto: tumori mammari
	Sovraespressione	Cane: gliomi
VEGFR3/Flt4	Sovraespressione	Cane: emangiosarcoma
Met		
Met	Sovraespressione	Cane: osteosarcoma, linee cellulari di mastocitoma, sarcoma istiocitario, emangiosarcoma e melanoma

Imatinib mesilato (Gleevec™)

Imatinib mesilato (Gleevec™, Novartis) è stato utilizzato nel cane soprattutto per il trattamento del MCT. Uno studio recente ha dimostrato una risposta alla terapia in 10 di 21 cani, con una percentuale di risposta del 100% dei MCT che presentavano ITD di *Kit* ($n = 5$) [Isotani *et al.*, 2008]. Un altro studio riporta una risposta parziale in 3 cani con mastocitoma sistemico. Due di questi pazienti sono sopravvissuti rispettivamente 117 e 159 giorni e il terzo era in vita dopo 75 giorni [Marconato *et al.*, 2008].

Un gatto con mastocitosi sistemica è stato trattato con *Gleevec* alla dose di 10 mg/kg. Il soggetto ha mostrato risposta completa a 5 settimane dal trattamento senza segni di tossicità. La neoplasia presentava una mutazione di *Kit* a livello di esone 8, ritenuta responsabile di un'attivazione costitutiva del recettore [Isotani *et al.*, 2006]. In uno studio successivo, *imatinib* ha indotto un'inibizione della crescita dose-dipendente in 3 linee cellulari di mastocitoma ottenute da gatti con mastocitosi sistemica. In tutti e tre i casi era presente una ITD a livello di esone 8 [Hadzijusufovic *et al.*, 2009]. Un altro studio ha dimostrato un effetto benefico di *imatinib* nel trattamento di 10 gatti (4 con lesioni cutanee solitarie, due con lesioni cutanee multiple e due con interessamento viscerale), di cui 8 con mutazioni del quinto dominio *simil-immunoglobulinico* di *Kit* (5 a carico dell'esone 8 e 3 a carico dell'esone 9). Complessivamente si sono riscontrate 4 risposte parziali, una risposta completa e malattia stabile in due casi [Isotani *et al.*, 2010].

Un altro tumore del gatto potenzialmente sensibile al trattamento con *imatinib* è il sarcoma iniettivo. Linee cellulari di sarcoma iniettivo esprimono PDGFR β e *Gleevec* ha dimostrato *in vitro* la capacità di bloccare la fosforilazione ligando-indotta e di inibire la crescita delle cellule tumorali [Katayama *et al.*, 2004]. È stato stimato inoltre che una parte dei fibrosarcomi di gatto esprimano *Kit*, altra molecola bersaglio di *imatinib* [Smith *et al.*, 2009].

Masitinib (Masivet™)

Masitinib (Masivet™, AB Science) è un TKI ad esclusivo uso veterinario che ha come bersaglio *Kit* e PDGFR. È stato completato uno studio controllato di fase II in 13 cani con MCT di grado II e III, in cui si sono avute due risposte complete, due risposte parziali e malattia stabile in 2 casi, con un buon livello di tollerabilità del farmaco [London, 2009]. Successivamente è stato condotto un *trial* randomizzato di fase III, in doppio cieco, controllato con placebo, su più di 200 cani con MCT di grado II e III non metastatici [Hahn *et al.*, 2008]. Nonostante la risposta complessiva non fosse significativamente diversa tra farmaco e placebo (15% vs. 16%), è stata osservata una differenza significativa nel tempo di progressione della malattia (75 giorni vs. 118 giorni) e questa differenza era maggiore nei cani con mutazioni di *Kit*, a suggerire un effetto biologico di *masitinib* sul MCT [Hahn *et al.*, 2008]. In un ulteriore studio dello stesso gruppo di ricerca, condotto su 132 cani con MCT di grado II e III non operabili, i risultati sono stati decisamente più incoraggianti. *Masitinib* ha determinato

Tabella 3.2 Inibitori tirosinchinasici utilizzati nel cane e nel gatto (da London, 2009).

TKI	Target	Tumori	Specie	Dose
Imatinib (<i>Gleevec</i> TM , Novartis)	<i>Abl, Kit, PDGFR</i>	MCT, sarcomi	Cane, gatto	5-10 mg/kg SID
Masitinib (<i>Masivet</i> TM , AB Science)	<i>Kit, PDGFR</i>	MCT	Cane, gatto	12.5 mg/kg SID
Toceranib (<i>Palladia</i> TM , Pfizer)	<i>Kit, PDGFR, Flt3, VEGFR</i>	MCT, sarcomi, carcinomi, melanomi, mielomi	Cane	3.25 mg/kg a giorni alterni

SID = una volta al giorno.

un significativo aumento del tasso di sopravvivenza rispetto al placebo (62% vs. 36% a 12 mesi e 40% vs. 15% a 24 mesi), con valori mediani di 617 giorni, contri i 322 del gruppo di controllo [Hahn *et al.*, 2010].

In uno studio recente è stata inoltre dimostrata in vitro la capacità di *masitinib* di inibire la crescita cellulare, e di indurre l'apoptosi e la soppressione della fosforilazione di PDGFR in due linee cellulari di sarcoma iniettivo felino [Lawrence *et al.*, 2011].

Toceranib (*Palladia*TM)

Il primo studio controllato sulla somministrazione di TKI in pazienti veterinari è stato un *trial* clinico di fase I per valutare l'efficacia e la sicurezza di un nuovo TKI multi *target*, *toceranib* (*Palladia*TM, Pfizer). Questa molecola, biodisponibile per via orale, è simile a *Sutent*TM e ha mostrato una potente attività inibitoria verso i membri delle famiglie di recettori con dominio tirosinchinasico interrotto, *i.e.* VEGFR e PDGFR (inclusi *Kit* e *Flt3*), esercitando quindi una doppia azione antiangiogenetica e antitumorale [London, 2009]. In questo studio sono stati arruolati 57 cani con diversi tumori, tra cui carcinomi, sarcomi, mastocitomi, melanomi e linfomi. Risposte oggettivamente misurabili sono state ottenute in 16 cani, per un tasso di risposta complessiva del 28%. In altri 15 cani si è avuto un arresto della progressione della malattia per più di 10 settimane, quindi l'attività biologica complessiva è stata del 54%. I risultati migliori si sono osservati nei MCT, dal momento che 10 degli 11 pazienti che presentavano mutazioni di *Kit* hanno mostrato risposta parziale o completa ($n = 9$) o malattia stabile ($n = 1$). Negli 11 cani con MCT senza mutazioni, si è osservata una risposta biologica del 30%, a suggerire che anche i cani senza apparenti disfunzioni di *Kit* possono avere un beneficio da *toceranib*. L'esatto meccanismo della risposta osservata in questi e negli altri tipi tumorali non è completamente chiara, ma è probabilmente dovuta all'effetto antiangiogenetico dell'inibizione di VEGFR e PDGFR [London *et al.*, 2003].

In seguito è stato portato a termine un altro studio per valutare gli effetti di

toceranib sull'attività di *Kit* nei MCT. Biopsie tumorali e campioni di sangue sono stati ottenuti da cani con MCT prima e 8 ore dopo la somministrazione di una singola dose orale di farmaco. Sono state quindi valutate le concentrazioni del farmaco nel sangue e i livelli di *Kit* fosforilato nelle biopsie tramite *Western blot*. L'inibizione della fosforilazione di *Kit* era evidente nella maggior parte dei casi e direttamente correlata sia ai livelli ematici di *toceranib* sia alla presenza di ITD [Pryer *et al.*, 2003].

Successivamente è stato condotto uno studio randomizzato, placebo-controllato in cani con MCT di grado II e III non operabili. Durante la fase cieca dello studio, la percentuale di risposta nei cani trattati ($n = 86$) è stata del 37.2% (7 risposte complete, 25 risposte parziali) *vs.* 7.9% (5 risposte parziali) del gruppo di controllo ($n = 63$). Dei 58 cani che hanno ricevuto il farmaco dopo il placebo, il 41.4% ha avuto una risposta oggettiva, per una risposta totale del 42.8% (21 remissioni complete e 41 risposte parziali) considerando tutti e 145 i cani trattati con *toceranib*. Come atteso, i MCT con mutazioni di *Kit* erano più sensibili al farmaco rispetto a quelli senza mutazioni (risposta dell'82% e del 55%, rispettivamente). Inoltre i cani senza coinvolgimento linfonodale mostravano una risposta migliore rispetto a quelli con linfonodi metastatici (67% *vs.* 46%). Inaspettatamente, il grado istologico del tumore non ha influenzato la risposta alla terapia, nonostante abbia avuto un impatto sul tempo di progressione, più breve nei tumori di grado III. Questi dati confermano che *toceranib* possiede un'attività biologica contro il MCT del cane e suggerisce che l'impiego del farmaco in aggiunta ai trattamenti standard possa migliorarne la prognosi [London *et al.*, 2009].

Tossicità clinica degli inibitori tirosinchinasi

Praticamente tutti i farmaci utilizzati in oncologia presentano una tossicità clinica di qualche tipo. In medicina umana la tossicità è più tollerata in prospettiva di un aumento della speranza di vita, mentre in medicina veterinaria, la qualità di vita è un fattore discriminante nella scelta del chemioterapico. Anche i TKI presentano tossicità verso i tessuti normali, presumibilmente a causa degli effetti cronici dell'inibizione dei recettori espressi nelle cellule non neoplastiche. Questi effetti sono più evidenti nel caso degli inibitori multi-*target* rispetto a quelli a spettro ridotto [London, 2009].

Gleevec non è stato molto utilizzato nel cane e nel gatto, e non sono stati condotti studi a lungo termine per caratterizzarne la potenziale tossicità. È noto il suo effetto di epatotossicità anche grave in una parte dei cani, associato a un aumento dei livelli di ALT e ALP che richiede l'interruzione della terapia. Altre tossicità di tipo gastroenterico o biochimico non sono state evidenziate. Nel gatto, *Gleevec* è apparentemente ben tollerato. Un *trial* clinico di fase I per valutare la tossicità di *Gleevec* è stato condotto su 9 gatti con diversi tumori. Dosi di 10-15 mg/kg sono risultate ben tollerate senza evidente tossicità ematologica e live tossicità gastroenterica. I gatti sono comunque stati trattati solo per brevi periodi e non sono stati effettuati studi sulla cinetica del farmaco [Lachowicz *et al.*, 2005].

Sia *Masivet* che *Palladia* possono indurre anoressia, vomito, diarrea ed emorragie

gastrointestinali. Queste tossicità sembrano essere più accentuate in corso di MCT, in cui i livelli di istaminemia sono piuttosto elevati, e possono contribuire ad aggravare le ulcere gastrointestinali farmaco-indotte. Il trattamento per la tossicità gastrointestinale prevede l'uso di antiacidi, inibitori della pompa protonica e antidiarroici. In caso di tossicità grave è indispensabile la sospensione temporanea del trattamento ed eventualmente una modificazione dei dosaggi e dei tempi di somministrazione [London, 2009].

Oltre agli effetti collaterali comuni alla chemioterapia citotossica, *Masivet* e *Palladia* possono indurre effetti collaterali specifici. In una piccola parte dei pazienti, *Masivet* può indurre una nefropatia proteino-disperdente di origine ancora da chiarire. Nel 2.5% dei casi è inoltre riportata anemia emolitica ma, ancora una volta, il meccanismo di questa tossicità non è conosciuto. *Palladia* può indurre invece una lieve neutropenia (in genere non al di sotto di 1550 cellule/ml), che non sembra predisporre a infezioni batteriche e tende a risolversi spontaneamente nel tempo. Inoltre, una piccola percentuale di cani trattati con *Palladia*, tende a sviluppare crampi muscolari, che devono essere trattati con anti-infiammatori non steroidei, tramadolo o con una pausa nella somministrazione del farmaco [London, 2009].

Bibliografia

- Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American Journal of Veterinary Research* 1996; **57**: 693-696.
- Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Veterinary Pathology* 2007; **44**: 823-830.
- Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas. *Journal of Comparative Pathology* 2009; **141**: 229-236.
- Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *The Canadian Veterinary Journal* 2010; **51**: 1109-1114.
- Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Experimental Cell Research* 2003; **284**: 122-130.
- Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, *et al.* Phase II multicenter study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory-metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology* 2005; **23**: 5568-5577.
- Barnes DM. c-erbB-2 amplification in mammary carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 1993 Suppl **17G**: 132-138.
- Bartke A. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 2005; **146**: 3718-3723.
- Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, *et al.* KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clinical Cancer Research* 2008; **14**: 6821-6828.
- Belfiore A, Frasca F. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2008; **13**: 381-406.
- Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, *et al.* The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)* 2009; **234**: 713-725.
- Bergkvist GT, Yool DA. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in veterinary oncology. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; **9**: 81-94.
- Bergkvist GT, Argyle DJ, Morrison L, Ma-

- cIntyre N, Hayes A, Yool DA. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki67 in feline oral squamous cell carcinomas (FOSCC). *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; **9**: 106-117.
- Bettini G, Morini M, Marcato PS. Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: histological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology* 2003; **129**: 283-293.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology* 2003; **4**: 915-925.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine* 2006; **354**: 567-578.
- Borzacchiello G, Russo V, Gentile F, *et al.* Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene* 2006; **25**: 1251-1260.
- Borzacchiello G, Mogavero S, De Vita G, Roperto S, Della Salda L, Roperto F. Activated platelet-derived growth factor beta receptor expression, PI3K-AKT pathway molecular analysis, and transforming signals in equine sarcoids. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 589-597.
- Brown RJ, Newman SJ, Durtschi DC, Leblanc AK. Expression of PDGFR- β and Kit in canine anal sac apocrine gland adenocarcinoma using tissue immunohistochemistry. *Veterinary and Comparative Oncology* 2012; **10**: 74-79.
- Burriss HA III. Shortcomings of current therapies for non-small-cell lung cancer: unmet medical needs. *Oncogene* 2009; **28**: S4-S13.
- Carboni JM, Lee AV, Hadsell DL, *et al.* Tumor development by transgenic expression of a constitutively active insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Research* 2005; **65**: 3781-3787.
- Coltella N, Manara MC, Cerisano V, *et al.* Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma. *FASEB Journal* 2003; **17**: 1162-1164.
- Dank G, Chien MB, London CA. Activating mutations in the catalytic or juxtamembrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 1129-1133.
- De Maria R, Olivero M, Iussich S, *et al.* Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer Research* 2005; **65**: 907-912.
- De Maria R, Miretti S, Iussich S, *et al.* met oncogene activation qualifies spontaneous canine osteosarcoma as a suitable pre-clinical model of human osteosarcoma. *Journal of Pathology* 2009; **218**: 399-408.
- Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: What is the value of current test methods? *European Journal of Cancer* 2005; **41**: 1383-1392.
- Dickinson PJ, Roberts BN, Higgins RJ, *et*

- al.* Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFRalpha and c-Met in canine primary brain tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; **4**: 132–140.
- Donnay I, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G and Versteegen J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroidhormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 1996; **60**: 251–254.
- Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE, London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 1718-1723.
- Dulak AM, Gubish CT, Stabile LP, Henry C, Siegfried JM. HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met. *Oncogene* 2011; **30**: 3625-3635.
- Ferracini R, Angelini P, Cagliero E, *et al.* MET oncogene aberrant expression in canine osteosarcoma. *Journal of Orthopedic Research* 2000; **18**: 253-256.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003; **9**: 669-676.
- Fieten H, Spee B, Ijzer J, Kik MJ, Penning LC, Kirpensteijn J. Expression of hepatocyte growth factor and the proto-oncogenic receptor c-Met in canine osteosarcoma. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 869-77.
- Flint AF, U'Ren L, Legare ME, Withrow SJ, Dernell W, Hanneman WH. Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Veterinary Pathology* 2004; **41**: 291-296.
- Fosmire SP, Dickerson EB, Scott AM, *et al.* Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Laboratory Investigation* 2004; **84**: 562-572.
- Frasca F, Pandini G, Sciacca L, *et al.* The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2008; **114**: 23–37.
- Frost D, Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 42-54.
- Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008; **67**: 8–15.
- Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archive* 2008; **453**: 123-132.
- Gama A, Gartner F, Alves A, Schmitt F. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 2009; **87**: 432–437.
- Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multi-

- forme. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009; **16**: 748–754.
- Garcia-Montero, A.C., Jara-Acevedo, M., Teodosio, C., *et al.* KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; **108**: 2366–2372.
- Giantin M, Vascellari M, Morello EM, *et al.* c-KIT messenger RNA and protein expression and mutations in canine cutaneous mast cell tumors: correlations with post-surgical prognosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012; **24**: 116-126.
- Gillett NA, Stegelmeier BL, Kelly G, Haley PJ and Hahn FF. Expression of epidermal growth factor receptor in plutonium-239-induced lung neoplasms in dogs. *Veterinary Pathology* 1992; **29**: 46–52.
- Grabarevic Z, Coric M, Seiwerth S, *et al.* Comparative analysis of hepatocellular carcinoma in men and dogs. *Collegium Antropologicum* 2009; **33**: 811–814.
- Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research* 1993; **53**: 3579–3584.
- Gregory-Bryson E, Bartlett E, Kiupel M, Hayes S, Yuzbasiyan-Gurkan V. Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BMC Cancer* 2010; **10**: 559.
- Grieco V, Banco B, Giudice C, Mosca F, Finazzi M. Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. *Journal of Comparative Pathology* 2010; **142**: 213-217.
- Hadzijasufovic E, Peter B, Rebuzzi L, *et al.* Growth-inhibitory effects of four tyrosine kinase inhibitors on neoplastic feline mast cells exhibiting a KIT exon 8 ITD mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; **132**: 243-250.
- Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 1301-1309.
- Hahn KA, Legendre AM, Shaw NG, *et al.* Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *American Journal of Veterinary Research* 2010; **71**: 1354-1361.
- Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Veterinary Pathology* 2010; **47**: 77-97.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 2004; **11**: 689-708.
- Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, *et al.* Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *American Journal of Pathology* 1995; **146**: 368-378.
- Hayes AM, Adams VJ, Scase TJ, Murphy

- S. Survival of 54 cats with oral squamous cell carcinoma in United Kingdom general practice. *Journal of Small Animal Practice* 2007; **48**: 394–399.
- Hendrick MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998; **213**: 1425–1426.
- Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular Signalling* 2006; **18**: 2089–2097.
- Higgins RJ, Dickinson PJ, Lecouteur RA, *et al.* Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFRalpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *Journal of Neuro-Oncology* 2010; **98**: 49–55.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: prospective for target therapies. *Lung Cancer* 2003, **41**: S29–S49.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2009; **28**: S32–S37.
- Hudachek SF, Kraft SL, Thamm DH, *et al.* Lung tumor development and spontaneous regression in lambs coinfecting with Jaagsiekte sheep retrovirus and ovine lentivirus. *Veterinary Pathology* 2010; **47**: 148–162.
- Isotani M, Tamura K, Yagihara H, *et al.* Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; **114**: 168–172.
- Isotani M, Ishida N, Tominaga M, *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 985–988.
- Isotani M, Yamada O, Lachowicz JL, *et al.* Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of KIT are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *British Journal of Haematology* 2010; **148**: 144–153.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *Journal of Clinical Oncology* 1999; **17**: 1983–1987.
- Jankovsky JM, Newkirk KM, Ilha MR, Newman SJ. COX-2 and c-kit expression in canine gliomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00302.x.
- Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM. Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2004; **54**: 25–33.
- Kaya H, Ragazzini T, Aribal E, Güney I, Kotiloglu E. Her-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein

- overexpression on ultrasound guided core-needle biopsy specimens of breast carcinoma. *Pathology Oncology Research* 2001; **7**: 279-283.
- Kennedy KC, Quorllo BA, Rose BJ, Thamm DH. Epidermal growth factor enhances the malignant phenotype in canine mammary carcinoma cell lines. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; **3**: 196-206.
- Klopfleisch R, Hvid H, Klose P, da Costa A, Gruber AD. Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. *Veterinary and Comparative Oncology* 2010; **8**: 293-301.
- Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual Review of Biochemistry* 1992; **61**: 307-330.
- Kumagai K, Uchida K, Miyamoto T, *et al.* Three cases of canine gastrointestinal stromal tumors with multiple differentiations and c-kit-expression. *Journal of Veterinary Medical Science* 2003; **65**: 1119-1122.
- Lachowicz JL, Post GS, Brodsky E. A phase I clinical trial evaluating imatinib mesylate (Gleevec) in tumor-bearing cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005; **19**: 860-864.
- Lai AZ, Abella JV, Park M. Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in Cell Biology* 2009; **19**: 542-551.
- Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Research* 2007; **67**: 593-599.
- Lamerato-Kozicki AR, Helm KM, Jubala CM, Cutter GC, Modiano JF. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Experimental Hematology* 2006; **34**: 870-878.
- Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS ONE* 2008, **3**, e1906.
- Lawrence J, Saba C, Gogal R, *et al.* Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00291.x.
- Letard S, Yang Y, Hanssens K, *et al.* Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research* 2008; **6**: 1137-1145.
- Liao AT, McMahan M, London CA. Identification of a novel germline MET mutation in dogs. *Animal Genetics* 2006; **37**: 248-252.
- Lipsitz D, Higgins RJ, Kortz GD, *et al.* Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 659-669.
- London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem

- duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 1999; **27**: 689–697.
- London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, *et al.* Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research* 2003; **9**: 2755-2768.
- London CA. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009; **24**: 106-112.
- London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, *et al.* Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research* 2009; **15**: 3856-3865.
- Looper JS, Malarkey DE, Ruslander D, Proulx D, Thrall DE. Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; **4**: 33–40.
- Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009; **77**: 400–410.
- Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxta-membrane coding region in canine mast cell neoplasms. *Journal of Investigative Dermatology*; **112**: 165-170.
- MacEwen EG, Kutzke J, Carew J, *et al.* c-Met tyrosine kinase receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells. *Clinical and Experimental Metastasis* 2003; **20**: 421-430.
- Marconato L, Bettini G, Giacoboni C, *et al.* Clinicopathological features and outcome for dogs with mast cell tumors and bone marrow involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 1001-1007.
- Martin de las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003; **80**: 363-367.
- Matsuyama S, Nakamura M, Yonezawa K, *et al.* Expression patterns of the erbB subfamily mRNA in canine benign and malignant mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science/the Japanese Society of Veterinary Science* 2001; **63**: 949–954.
- McCleese JK, Bear MD, Kulp SK, Mazcko C, Khanna C, London CA. Met interacts with EGFR and Ron in canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; doi: 10.1111/j.1476-5829-2011.00309.x.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. KIT expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of C-kit. *Modern Pathology* 2000; **13**: 536-541.
- Millanta F, Calandrella M, Citi S, Della Santa D, Poli A. Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic poten-

- tial. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 30-34.
- Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* 2006; **81**: 350-357.
- Minke JM, Schuurin E, van den Berghe R, *et al.* Isolation of two distinct epithelial cell lines from a single feline mammary carcinoma with different tumorigenic potential in nude mice and expressing different levels of epidermal growth factor receptors. *Cancer Research* 1991; **51**: 4028-4037.
- Modiano JF, Kokai Y, Weiner DB, Pykett MJ, Nowell PC, Lyttle CR. Progesterone augments proliferation induced by epidermal growth factor in a feline mammary adenocarcinoma cell line. *Journal of Cellular Biochemistry* 1991; **45**: 196-206.
- Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2009; **361**: 947-957.
- Montone KT, van Belle P, Elenitsas R, Elder DE. Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Modern Pathology* 1997; **10**: 939-944.
- Morris PG, Abrey LE. Novel targeted agents for platelet-derived growth factor receptor and c-KIT in malignant gliomas. *Targeted Oncology* 2010; **5**: 193-200.
- Murakami A, Mori T, Sakai H, *et al.* Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; **9**: 219-224.
- Neo S, Kansaku N, Furuichi M, *et al.* Molecular cloning of the canine c-Met/HGF receptor and its expression in normal and regenerated liver. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005; **67**: 525-529.
- Nerurkar VR, Seshadri R, Mulherkar R, Ishwad CS, Lalitha VS, Naik SN. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *International Journal of Cancer* 1987; **40**: 230-232.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001; **37**: S9-S15.
- O'Brien CS, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Resistance to endocrine therapy: Are breast cancer stem cells the culprits? *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2009; **14**: 45-54.
- Pan J, Kong L, Lin S, Chen G, Chen Q, Lu JJ. The clinical significance of coexpression of cyclooxygenases-2, vascular endothelial growth factors, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *The Laryngoscope* 2008; **118**: 1970-1975.
- Peters MA, Mol JA, van Wolferen ME, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Teerds KJ, van Sluijs FJ. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. *Reproductive Biology and Endo-*

- crinology* 2003; **1**: 22.
- Petrova TV, Bono P, Holnthoner W *et al.* VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* 2008; **13**: 554-556.
- Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, *et al.* Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005; **23**: 6657-6663.
- Pircher A, Ploner F, Popper H, Hilbe W. Rationale of a relaunch of gefitinib in Caucasian non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2010; **69**: 265-271.
- Pryer NK, Lee LB, Zadovaskaya R, Yu X, Sukbuntherng J, Cherrington JM, London CA. Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clinical Cancer Research* 2003; **9**: 5729-5734.
- Queiroga FL, Perez-Alenza D, Silvan G, Pena L, Illera JC. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009; **115**: 9-13.
- Raica M, Jung I, Cimpean AM, Suciuc C, Mureşan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: Are we ready for change? *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2009; **50**: 5-13.
- Rebuzzi L, Willmann M, Sonneck K, *et al.* Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007; **115**: 320-333.
- Resnik JL, Reichart DB, Huey K, Webster NJ, Seely BL. Elevated insulin-like growth factor I receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer. *Cancer Research* 1998; **58**: 1159-1164.
- Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2004; **130**: 99-104.
- Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *British Journal of Cancer* 2007; **96**: 408-416.
- Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* 2010; **116**: 1234-1242.
- Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, *et al.* C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Archive* 2008; **452**: 27-32.
- Rodriguez-Cariño C, Fondevila D, Segales J, Rabanal R: Expression of KIT receptor in feline cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 878-883.
- Rosanda J, Bindi M, Pinelli M, Castiglioni M. Nuove strategie terapeutiche ne carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico. *Recenti Progressi in Medicina* 2008; **99**: 1-9.
- Rungkipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immu-

- nohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 1999; **61**: 27-32.
- Rutteman GR, Foekens JA, Portengen H, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. *Breast Cancer Research and Treatment* 1994; **30**: 139-146.
- Sabattini S, Bettini G. An immunohistochemical analysis of canine haemangioma and haemangiosarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 2009; **140**: 158-168.
- Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research* 2010; **6**: 5.
- Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007; **75**: 770-787.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; **7**: 106-114.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; **235**: 177-182.
- Smith U, Gale EA. Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia* 2009; **52**: 1699-1708.
- Smith AJ, Njaa BL, Lamm CG. Immunohistochemical expression of c-KIT protein in feline soft tissue fibrosarcomas. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 934-939.
- Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental Cell Research* 2009; **315**: 683-696.
- Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline oral neoplasia: a ten-year survey. *Veterinary Pathology* 1989; **26**: 121-128.
- Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological Reviews* 1996; **76**: 1005-1026.
- Stoica G, Tasca SI, Kim HT. Point mutation of neu oncogene in animal peripheral nerve sheath tumors. *Veterinary Pathology* 2001; **38**: 679-688.
- Stoica G, Kim HT, Hall DG, Coates JR. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Veterinary Pathology* 2004; **41**: 10-19.
- Tamburini BA, Phang TL, Fosmire SP, *et al.* Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma. *BMC Cancer* 2010; **10**: 619.
- Thariat J, Yildirim G, Mason KA, Garden AS, Milas L, Ang KK. Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology* 2007; **12**: 99

- 110.
- Thomas R, Duke SE, Wang HJ, *et al.* 'Putting our heads together': insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 2009; **94**: 333-349.
- Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, *et al.* Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 169-181.
- Usher SG, Radford AD, Villiers EJ, Blackwood L. RAS, FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias. *Experimental Hematology* 2009; **37**: 65-77.
- Ward CW and Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* 2009; **31**: 422-434.
- Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2004; **41**: 371-377.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia* 2006; **8**: 104-111.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 2007; **44**: 298-308.
- Wikstrand CJ, Bigner DD. Constitutive activation of truncated EGF receptors in glioblastoma. In: *EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy*, JD Haley and WJ Gullick, eds., Humana Press, New York, NY, USA, 2008: 277-292.
- Winston J, Craft DM, Scase TJ, Bergman PJ. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 2005; **3**: 8-15.
- Yonemaru K, Sakai H, Murakami M, Yanai T, Masegi T. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (Flt-1, Flk-1, and Flg-1) in canine vascular tumors. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 971-980.
- Yu CH, Hwang DN, Yhee JY, *et al.* Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. *Journal of Veterinary Science* 2009; **10**: 1-7.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology* 2002; **39**: 529-535.

Fattori istologici e immunoistochimici di prognosi nel mastocitoma cutaneo felino

4.1 Introduzione

I mastocitomi (MCT) sono tra i tumori cutanei più comuni nel gatto, con una prevalenza stimata fino al 21% [Macy e Reynolds, 1981; Miller *et al.*, 1991].

Il mastocitoma felino insorge più frequentemente a livello di testa e collo, seguono in ordine di frequenza tronco e arti [Buerger e Scott, 1987; Lepri *et al.*, 2003; Macy e Reynolds, 1981; Miller *et al.*, 1991]. I noduli di dimensioni maggiori sono spesso ulcerati e alopecici. Tumori multipli possono insorgere dal 12% al 20% dei casi [Gross *et al.*, 2005].

I mastocitomi cutanei felini sono classificati istologicamente in *mastocitomi mastocitici* (che si riscontrano più di frequente) e *mastocitomi atipici* [Wilcock *et al.*, 1986; Gross *et al.*, 2005]. I mastocitomi mastocitici sono ulteriormente suddivisi in *ben differenziati* e *pleomorfi* [Gross *et al.*, 2005]. I mastocitomi ben differenziati si presentano generalmente come neoformazioni dermiche variamente demarcate non capsulate che possono infiltrare il sottocute. Questi tumori sono composti da foglietti di cellule che richiamano morfologicamente l'aspetto dei mastociti non neoplastici, con minimo pleomorfismo e rare figure mitotiche. L'infiltrato di granulociti eosinofili è in genere scarso e sono talora presenti sparsi aggregati linfocitari [Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005]. I MCT pleomorfi sono rari, tendono maggiormente a infiltrare derma e tessuto sottocutaneo e sono composti da cellule voluminose, con nuclei eccentrici, nucleoli prominenti e un numero variabile di cellule giganti con nuclei polilobati o multipli [Gross *et al.*, 2005]. Alcuni autori riportano un'elevata

attività mitotica dei MCT pleomorfi, mentre in altri studi il numero di mitosi è basso [Hendrick *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2005]. I MCT pleomorfi sono più spesso infiltrati da granulociti eosinofili [Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005]. Il MCT cutaneo felino atipico è raro e descritto quasi esclusivamente nei gatti Siamesi giovani, nei quali può regredire spontaneamente [Wilcock *et al.*, 1986; Chastain *et al.*, 1988]. I MCT atipici sono anche chiamati “scarsamente granulari” o “istiocitici”, nonostante l’uso di quest’ultimo termine non sia incoraggiato per non generare confusione con le vere proliferazioni istiocitarie [Wilcock *et al.*, 1986; Gross *et al.*, 2005]. Nei MCT atipici, le cellule neoplastiche sono voluminose, di forma da poligonale a fusata, con abbondante citoplasma anfofilo. I nuclei sono grandi e vescicolosi, occasionalmente indentati; le mitosi sono rare. I granulociti eosinofili e i linfociti intratumorali tendono ad essere più numerosi rispetto al MCT mastocitico [Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005]. La granularità citoplasmatica può non essere evidente all’ematossilina eosina nei MCT atipici, ma una minima quantità di granuli è quasi sempre presente, almeno in una parte delle cellule, nelle sezioni colorate con Giemsa o blu di toluidina [Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005].

Gran parte dei MCT cutanei felini sono considerati benigni, nonostante la tendenza a dare recidive locali o all’insorgenza multicentrica [Buerger e Scott., 1987; Gross *et al.*, 2005]. La percentuale di tumori cutanei che danno metastasi viscerali è generalmente bassa, ma variabile (0-22%) [Wilcock *et al.*, 1986; Buerger e Scott., 1987; Carpenter *et al.*, 1987; Lepri *et al.*, 2003; Thamm e Vail, 2007]. In molti studi, solo una percentuale di tumori compresa dal 7% al 20% tende a comportarsi in modo aggressivo e a determinare la morte dell’animale [Wilcock *et al.*, 1986; Buerger e Scott., 1987; Molander-McCrary *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002; Lepri *et al.*, 2003; Litster e Sorenmo, 2006]. La presenza di noduli cutanei disseminati può essere associata alla concomitante presenza di MCT viscerali, ed è associata a una prognosi peggiore [Litster e Sorenmo., 2006; Ogilvie e Moore, 2001]. Comunque gatti con MCT cutanei multipli non sempre sviluppano MCT sistemici, e gatti con tumori singoli possono successivamente sviluppare tumori cutanei multipli senza evidenza di interessamento viscerale [Ogilvie e Moore, 2001].

Le caratteristiche morfologiche tipicamente associate a una maggiore aggressività, come il pleomorfismo e la crescita infiltrante, non sono correlate al comportamento biologico nel mastocitoma felino, ad eccezione dell’attività proliferativa. Il sistema di *grading* istologico proposto da Patnaik *et al.* (1984) per il MCT del cane non è considerato di utilità prognostica nel gatto [Buerger e Scott, 1987; Gross *et al.*, 2005; Ogilvie e Moore, 2001].

Nel cane, i MCT con localizzazione aberrante citoplasmatica del recettore tirosinchinasico *Kit* hanno una prognosi peggiore rispetto a quelli con localizzazione di membrana [Webster *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2007]. L’espressione citoplasmatica di *Kit* è stata dimostrata tramite immunoistochimica nei MCT cutanei felini, ma il

suo rapporto con il comportamento biologico dei tumori non è stato investigato.

L'acquisizione di attività telomerasica, un meccanismo di immortalizzazione delle cellule, è stato investigato in diversi tumori del cane e del gatto [Mandrioli *et al.*, 2007; Nasir, 2008]. Nell'uomo i precursori dei mastociti presentano una transitoria induzione dell'attività telomerasica [Chaves-Dias *et al.*, 2001], ma l'espressione di telomerasi nel mastocitoma felino non è mai stata investigata.

L'identificazione della minoranza di mastocitomi cutanei felini a comportamento biologico potenzialmente aggressivo resta pertanto una sfida. Da queste considerazioni è nata un'indagine retrospettiva su una casistica di MCT cutanei felini, che sono stati caratterizzati da un punto di vista istologico e immunoistochimico. Tutti i parametri sono stati valutati in funzione del decorso clinico dei casi, allo scopo di individuare i parametri di maggiore utilità prognostica.

4.2 Materiali e Metodi

Criteri di selezione e informazioni cliniche

È stato effettuato uno studio retrospettivo raccogliendo materiale di archivio relativo a casi di mastocitoma cutaneo felino pervenuti in un periodo di tempo di 5 anni (2002-2007) al servizio diagnostico di Anatomia Patologica (Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna).

Nei casi con MCT multipli sono stati inclusi i noduli di dimensioni maggiori. I casi con concomitante coinvolgimento viscerale sono stati esclusi.

Per ciascun caso sono stati raccolti i dati relativi a segnalamento, sede, dimensione e distribuzione delle lesioni (singole o multiple) e al decorso clinico. Le informazioni sul *follow-up*, ottenute attraverso interviste telefoniche, hanno riguardato l'intervallo tra l'osservazione della lesione neoplastica e l'asportazione chirurgica, le terapie effettuate, la comparsa di metastasi e/o recidive, l'attuale stato di salute del gatto o il tempo di sopravvivenza. I casi con dati insufficienti sono stati esclusi. Il periodo minimo di *follow-up* richiesto per l'inclusione è stato di due anni dalla diagnosi.

Esame istologico

I campioni, precedentemente fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina, sezionati a 4 μm di spessore e colorati con *ematossilina-eosina* (EE) e *blu di toluidina*, sono stati sottoposti a nuova osservazione istologica per la conferma della diagnosi e la selezione delle sezioni più rappresentative. In base alle caratteristiche morfologiche le neoplasie sono state classificate come tipiche, pleomorfe e atipiche [Wilcock *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2005]. Ulteriori parametri istologici, tra cui l'indice mitotico, la granularità del citoplasma e l'infiltrato di granu-

lociti eosinofili e linfociti sono stati valutati senza essere a conoscenza del decorso clinico. L'indice mitotico è stato calcolato contando il numero di figure mitotiche in 10 campi a forte ingrandimento (CFI, 400x). L'infiltrato di granulociti eosinofili è stato valutato sulle sezioni colorate con eosina secondo il *metodo di Dominici* (1: 10.000 per 24 ore), assegnando a ciascun campione un punteggio da 0 a 3 secondo i criteri illustrati nella **Tabella 4.1**. La presenza di granulazioni intracitoplasmatiche è stata classificata in base all'intensità della reazione metacromatica al blu di toluidina. In **Tabella 4.1** sono elencati in dettaglio i parametri istologici valutati e i punteggi attribuiti a ciascun parametro. Il *pattern* di crescita non è stato valutato a causa della mancanza di una quantità sufficiente di tessuto nei campioni ottenuti tramite biopsie incisionali.

Esame immunoistochimico

Ulteriori sezioni dei campioni selezionati sono state sottoposte a colorazioni immunoistochimiche, con un pannello anticorpale composto da CD117 (proteina *Kit*), *hTERT* e MIB-1 alle diluizioni indicate nella **Tabella 4.2**. Per la rivelazione della reazione immunoistochimica è stata impiegata la tecnica *streptavidina-biotina-perossidasi*, utilizzando un kit commerciale (LSAB™, *Dako*, Glostrup, Danimarca). Dopo incubazione con perossido di idrogeno allo 0.3% in metanolo per 20 minuti per bloccare l'attività delle *perossidasi endogene* e pretrattamento in forno a microonde (750W) in tampone citrato (con le modalità indicate nella **Tabella 4.2**) per la *riesposizione dell'antigene*, le sezioni sono state incubate per una notte a 4°C in camera umida con l'anticorpo primario opportunamente diluito in PBS (0.01 M; pH 7.4). Quindi, previo lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate dapprima con l'anticorpo secondario (IgG *anti-rabbit* coniugato con biotina) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con il complesso streptavidina-perossidasi per 25 minuti a temperatura ambiente. Dopo un passaggio di 12 minuti nella soluzione cromogena DAB (*diaminobenzidina* 0,02% e H₂O₂ 0,001% in PBS) sono state risciacquate in PBS e quindi in acqua corrente, colorate con una colorazione di contrasto (*ematossilina di Papanicolau*), deidratate e montate con DPX™ (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Sono stati utilizzati appropriati controlli positivi allo scopo di valutare la specificità delle reazioni e accertare l'adeguata *cross*-reattività nel tessuto di gatto.

L'immunopositività nei confronti del CD117 è stata valutata sulla base della citolocalizzazione (di membrana, citoplasmatica focale, citoplasmatica diffusa) [Webster *et al.*, 2004]. È stata inoltre graduata mediante un punteggio (*Kit immunoreactivity score*, *Kit IS*) come prodotto della percentuale di cellule positive e dell'intensità della reazione (**Tabella 4.1**).

L'attività telomerasica è stata valutata considerando l'intensità della reazione immunoistochimica alla presenza della proteina *hTERT* (0: assente; 1: lieve; 2: moderata; 3; forte). L'attività telomerasica e l'attività replicativa delle cellule neoplastiche sono state quantificate valutando con un programma semiautomatico di analisi di

Tabella 4.1 Parametri istologici e immunoistochimici valutati in 25 mastocitomi cutanei di gatto.

Parametri istologici	Colorazione	Sistema di valutazione
Istotipo	EE	Mastocitico ben differenziato Mastocitico pleomorfo Atipico/scarsamente granulare
Attività mitotica	EE	Numero totale di mitosi in 10 campi a forte ingrandimento (400x)
Granularità citoplasmatica	Blu di toluidina	1 – Bassa densità di granuli nella maggior parte delle cellule neoplastiche 2 - Moderate densità di granuli nella maggior parte delle cellule o elevate densità in meno della metà delle cellule neoplastiche 3 – Elevata densità di granuli nella maggior parte delle cellule neoplastiche
Infiltrato di granulociti eosinofili	Eosina	0 – Assente 1 – Lieve 2 – Moderato 3 – Elevato
Infiltrato linfocitario	EE	0 – Assente 1 – Lieve 2 – Moderato 3 – Elevato
Parametri immunoistochimici	Marker	Sistema di valutazione
Citolocalizzazione della proteina <i>Kit</i> (<i>Kit pattern</i>)	CD117	Positività prevalentemente di membrana, segnale citoplasmatico minimo o assente Positività citoplasmatica focale Positività citoplasmatica diffusa
Livello di espressione della proteina <i>Kit</i>	CD117	<i>Kit immunoreactivity score (Kit IS)</i> – Prodotto della proporzione di cellule positive (1, < 10%; 2, 11-30%; 3, 31-60%; 4, > 60%) e dell'intensità del segnale (1, lieve; 2, moderata, 3, elevata)
Attività telomerastica	<i>hTERT</i>	TERT index – Percentuale media di cellule neoplastiche positivamente marcate valutata in 5 campi a forte ingrandimento (400x) mediante analizzatore di immagine
Attività replicativa	MIB-1	MIB-1 index – Percentuale media di cellule neoplastiche positivamente marcate valutata in 5 campi a forte ingrandimento (400x) mediante analizzatore di immagine

EE = Ematossilina Eosina.

Tabella 4.2 *Pannello anticorpale utilizzato per le prove immunohistochimiche.*

Marker	Anticorpo primario e casa produttrice	Diluizione	Riesposizione dell'antigene^a
CD117	<i>Coniglio</i> , policlonale Dako™	1:100	2 cicli di 5 minuti in forno a microonde
hTERT	<i>Topo</i> , monoclonale Novocastra™	1:50	2 cicli di 5 minuti in forno a microonde
MIB1	<i>Topo</i> , monoclonale Dako™	1:30	4 cicli di 5 minuti in forno a microonde

^a In tampone citrato a pH 6.0.

immagine (LUCIA™, *Nikon*, Tokyo, Giappone) la percentuale di nuclei mastocitari positivamente marcati rispettivamente da hTERT (TERT *index*, attività telomerasica) e MIB-1 (MIB-1 *index*, attività replicativa) (Tabella 4.1).

Analisi statistica

Le caratteristiche istologiche e immunofenotipiche rilevate sono state messe in relazione ai dati relativi a segnalamento, sede, dimensione e distribuzione delle lesioni (singole o multiple) e al decorso clinico dei casi, nel tentativo di caratterizzare il comportamento biologico del tumore e ricercare eventuali fattori prognostici.

Le differenze nei parametri istologici valutati a secondo dell'istotipo e all'esito clinico sono state valutate mediante il *test esatto di Fisher* e il test di *analisi della varianza per variabili non parametriche di Kruskal-Wallis*. Il test dei ranghi di Spearman è stato utilizzato per correlare indice mitotico, *Kit IS*, TERT *index* e MIB-1 *index*.

Il limite di significatività (*P*) è stato posto uguale o inferiore a 0.05. I test sono stati eseguiti con SPSS Statistics™ v. 17.0 (IBM, Somers, NY, USA) e Prism™ v. 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

Tabella 4.3 Segnalamento e decorso clinico di 25 gatti con mastocitoma cutaneo.

ID	Sesso ^a	Età (anni)	Razza	Localizzazione e dimensioni del tumore	Istotipo ^b	Decorso clinico ^c
1	Fs	14	Europeo	collo e arto (2 noduli), 1.5 e 2 cm	BD	Presente 2 mesi prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; deceduto per insufficienza renale cronica (3 anni)
2	Mc	10	Europeo	arto, 0.5 cm	BD	Presente 6 mesi prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; deceduto per insufficienza renale cronica (55 mesi)
3	Fs	10	Europeo	noduli disseminati (> 15), 0.2-1 cm	At	Exeresi palliativa; insorgenza di nuovi noduli; sospetto clinico di M spleniche; soppresso a 6 mesi dalla D
4	Fs	10	Europeo	coscia, 2.5 cm	PI	Presente 2 anni prima dell'escissione chirurgica; M spleniche; deceduto a 1 mese dalla D
5	F	10	Europeo	pinna auricolare e tronco (2 noduli), 3 cm e 0.5 cm	BD	Escissione chirurgica; nessuna R o M; deceduto per altre cause (4 anni)
6	Mc	1	Europeo	tronco, 0.5 cm	BD	Presente 1 mese prima dell'escissione chirurgica; in terapia con corticosteroidi; R locale; in vita (50 mesi)
7	Mc	4	Europeo	reg. temporale, 0.5 cm	PI	Presente 2 settimane prima dell'escissione chirurgica (margini indenni); nessuna R o M; in vita (42 mesi)
8	Fs	6	Meticcio a pelo lungo	labbro	PI	M spleniche; soppresso a 2 mesi dalla D
9	F	10	Europeo	noduli disseminati, 0.5-2 cm	PI	Escissione chirurgica non praticabile; in terapia con corticosteroidi; malattia progressiva; soppresso a 6 mesi dalla D per sovrainfezione delle lesioni
10	F	15	Siamese	noduli disseminati, 0.5-2.5 cm	PI	Presente 3 mesi prima dell'escissione chirurgica; exeresi palliativa; sospetto clinico di M spleniche; deceduto a 5 mesi dalla D
11	Fs	9	Europeo	spalla, 0.5 cm	BD	Deceduto per altre cause (19 mesi)
12	Fs	15	Europeo	testa, 0.5-1 cm	PI	Escissione chirurgica; insorgenza di M spleniche; praticata splenectomia; in vita (4 anni)
13	Mc	7	Europeo	reg. temporale, 0.4 cm	BD	Presente 6 mesi prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (3 anni)
14	Mc	7	Europeo	pinna auricolare, 0.5 cm	BD	Presente 2 mesi prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (27 mesi)
15	Fs	7	Europeo	reg. periorbitale, 1 cm	BD	Presente 6 mesi prima dell'escissione chirurgica (margini infiltrati); nessuna R o M; deceduto per altre cause (14 mesi)
16	F	15	Europeo	spalla, 4 cm	At	Presente 6 mesi prima dell'escissione chirurgica (margini indenni); R locale; in vita (26 mesi)
17	Fs	10	Europeo	testa, 0.5 cm	BD	Comparso 1 anno prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (31 mesi)
18	F	8	Europeo	reg. periorbitale	BD	Mai escissione chirurgica; periodica somministrazione di corticosteroidi quando il prurito è intenso; in vita (26 mesi)
19	Mc	8	Europeo	noduli disseminati, 0.5-1 cm	BD	Exeresi palliativa; molteplici nuove insorgenze periodicamente asportate; in vita (24 mesi)
20	Mc	6	Europeo	tronco, 1 cm	BD	Escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (24 mesi)
21	Mc	5	Europeo	coscia, 0.7 cm	BD	Presente 2 settimane prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (24 mesi)
22	Fs	12	Europeo	tronco e coscia (2 noduli), 1.5 e 0.8 cm	BD	Presente 3 settimane prima dell'escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (24 mesi)
23	Fs	16	Europeo	reg. periorbitale, 1 cm	BD	Escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (24 mesi)
24	Mc	2	Europeo	reg. temporale 0.5 cm	At	Escissione chirurgica; R locale 2-3 mesi dopo; in vita (24 mesi)
25	Fs	8	Europeo	groppe, 2 cm	PI	Escissione chirurgica; nessuna R o M; in vita (24 mesi)

^a M = maschio; F = femmina; Mc = maschio castrato; Fs = femmina sterilizzata.^b BD = ben differenziato; PI = pleomorfo; At = atipico.^c R = recidiva; M = metastasi; D = diagnosi.

4.3 Risultati

Segnalamento e presentazione clinica

In totale sono state selezionate 17 biopsie escissionali e 8 biopsie incisionali di mastocitoma felino. Sesso, età e razza sono state registrate in tutti i casi (**Tabella 4.3**). C'erano 23 Europei, un meticcio a pelo lungo e un Siamese; i maschi erano il 36% ($n = 9$; tutti castrati) e le femmine erano il 64% ($n = 16$; 11 sterilizzate). L'età media era di 9 anni (*range*, 1-16 anni).

Ventuno casi erano noduli singoli. In 18 casi era presente un unico nodulo (in 10 casi localizzato a livello di testa e collo, in 3 casi sul tronco e in 5 a carico degli erti); nei restanti 3 casi (ID 1, 5, 22) erano presenti due noduli in regioni distanti (collo e arto, testa e tronco, tronco e arto). In altri 4 casi (ID 3, 9, 10, 19) erano presenti da 10 a 20 noduli disseminati distribuiti su tutta la superficie corporea. Il diametro maggiore dei noduli è stato registrato in 23 casi, ed era compreso tra 0.2 e 4 cm.

Esame istologico

Quindici MCT sono stati classificati come mastocitici ben differenziati. Questi tumori erano composti da foglietti e cordoni di cellule rotonde di dimensioni uniformi con limiti citoplasmatici evidenti. I nuclei erano rotondi e centrali, con cromatina finemente dispersa. Il pleomorfismo nucleare era lieve, con nucleoli generalmente non evidenti (**Figura 4.1**). Le figure mitotiche erano rare (attività mitotica media, 2 mitosi/10 CFI; *range*, 0-5) (**Tabella 4.4**).

Sette MCT, classificati come mastocitici pleomorfi, presentavano atipie nucleari marcate, con un numero variabile di cellule giganti, talora multinucleate (**Figura 4.1**). L'attività mitotica media era di 15 per 10 CFI (**Tabella 4.4**).

Tre mastocitomi sono stati classificati come atipici o scarsamente granulari. Comprendevo aree con foglietti compatti di cellule di forma da poligonale ad allungata, con grandi nuclei vescicolosi, talora indentati (**Figura 4.1**). L'attività mitotica era variabile (rispettivamente 1, 3 e 12 per 10 CFI) (**Tabella 4.4**).

I mastocitomi pleomorfi avevano un'attività mitotica media significativamente più elevata rispetto ai MCT ben differenziati e atipici ($P = 0.006$).

I MCT ben differenziati avevano una densità di granuli citoplasmatici da elevata (11 di 15; 73%) a moderata (4 di 15; 27%). I mastocitomi pleomorfi erano densamente granulati in due di 7 casi (29%), moderatamente in 4 (57%) e scarsamente in uno (14%). I MCT atipici avevano una densità di granuli da moderata (1 di 3; 33%) a elevata (2 di 3; 67%). La granularità era significativamente più elevata nei MCT ben differenziati ($P = 0.007$). Anche quando presenti in grande quantità, i granuli avevano generalmente una bassa metacromasia (**Figura 4.1; Tabella 4.4**).

L'infiltrato di granulociti eosinofili era assente in 10 di 15 casi (67%) e pre-

Tabella 4.4 Parametri istologici valutati in 25 mastocitomi cutanei di gatto raggruppati per istotipo.

Istotipo	Att. mitotica ^a Media (range)	Granuli citoplasmatici ^a N. casi (%)			Granulociti eosinofili ^a N. casi (%)			Infiltrato linfocitario ^a N. casi (%)				
		1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Mastocitico ben differenziato (n = 15; 60%)	2 (0 – 5)	0/15 (0%)	4/15 (26.7%)	11/15 (73.3%)	10/15 (66.7%)	2/15 (13.3%)	1/15 (6.7%)	2/15 (13.3%)	9/15 (60%)	4/15 (26.6%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)
Mastocitico pleomorfo (n = 7; 28%)	15 (2 – 29)	1/7 (14.3%)	4/7 (57.1%)	2/7 (28.6%)	2/7 (28.6%)	4/7 (57.1%)	1/7 (14.3%)	0/7 (0%)	1/7 (14.3%)	2/7 (28.6%)	3/7 (42.9%)	1/7 (14.3%)
Atipico (n = 3; 12%)	5 (1 – 12)	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)
Totale (n = 25)	6 (0 – 29)	3/25 (12%)	9/25 (36%)	13/25 (52%)	12/25 (48%)	6/25 (24%)	2/25 (8%)	5/25 (20%)	10/25 (40%)	6/25 (24%)	5/25 (20%)	4/25 (16%)

^a I sistemi di valutazione utilizzati per i diversi parametri sono elencati in **Tabella 4.1**.

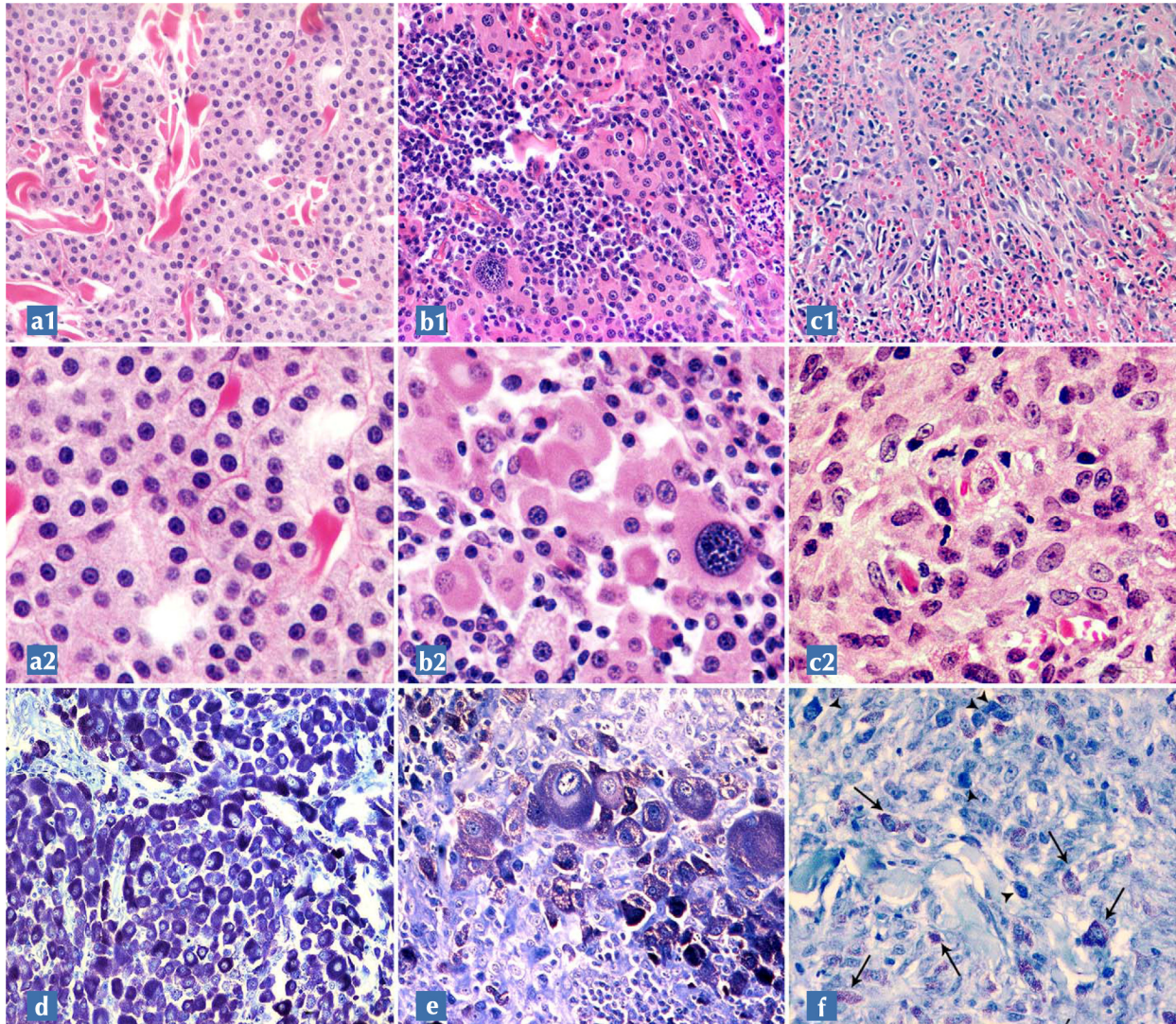


Figura 4.1 Gatto. cute. **(a)** Mastocitoma mastocitico ben differenziato. Lamine cellulari di cellule morfologicamente simili a mastociti normali, con nuclei di forma rotondeggiante, scarsamente pleomorfi e cromatina addensata. **(b)** Mastocitoma mastocitico pleomorfo. Cellule con nuclei ampi, spesso eccentrici, estremamente irregolari e anomala distribuzione cromatinica; multifocale presenza di cellule giganti o multinucleate. Il citoplasma è abbondante e eosinofilo. Sono visibili fenomeni di eritrofagocitosi da parte dei MC neoplastici. **(c)** Mastocitoma atipico. Cordoni e fasci di cellule voluminose di forma irregolare, con nuclei allungati, vescicolosi, nucleoli apparenti e citoplasma spesso finemente vacuolizzato. Si noti la presenza di granulociti eosinofili infiltranti il tessuto tumorale. Ematossilina-eosina, 20x (a1, b1, c1) e 40x (a2, b2, c2). Densità di granuli intracitoplasmatici rispettivamente scarsa **(d)**, moderata **(e)** ed elevata **(f)**. Blu di toluidina, 20x.

sente nei restanti casi in modo lieve ($n = 2$; 13%), moderato ($n = 1$; 7%) ed elevato ($n = 2$; 13%). I MCT pleomorfi non avevano eosinofili in due di 7 casi (29%), mentre ne avevano una scarsa quantità in 4 casi (57%) e una moderata quantità in un caso (14%). Tutti e tre i MCT atipici presentavano un abbondante infiltrato eosinofilo, significativamente superiore rispetto a MCT ben differenziati e pleomorfi ($P = 0.007$) (**Figura 4.1**; **Tabella 4.4**).

Aggregati nodulari di piccoli linfociti erano presenti in 6 di 15 (40%) MCT ben differenziati, in 6 di 7 (86%) MCT pleomorfi e in tutti i MCT atipici ($P = 0.008$) (**Figura 4.1**; **Tabella 4.4**).

Esame immunohistochimico

La ricerca della proteina *Kit* è stata effettuata in tutti i casi. I mastociti neoplastici sono stati marcati dall'anticorpo CD117 in 21 di 25 casi (84%). Otto (32%) avevano un *pattern* prevalentemente di membrana; 11 (44%) mostravano un *pattern* citoplasmatico focale, prevalentemente paranucleare e due (8%) mostravano una positività citoplasmatica diffusa, da lieve a intensa (**Figura 4.2**; **Tabella 4.5**). Non erano presenti differenze significative nel *pattern* di espressione di *Kit* a seconda dell'istotipo. Al contrario il *Kit* IS era significativamente più elevato nei MCT pleomorfi (*Kit* IS medio, 8) rispetto ai MCT ben differenziati o atipici (*Kit* IS medio, 3; $P = 0.001$).

L'immunohistochimica per *hTERT* è stata effettuata in 22 casi su 25, in quanto nei casi N. 8, 11 e 12 non era disponibile una quantità sufficiente di tessuto. L'attività telomerasica è stata dimostrata in 15 di 22 casi (68%); il *TERT index* nei casi positivi era compreso tra 10 e 87.4% (media, 44.2%); il segnale era nucleolare o nucleare con rinforzo nucleolare (**Figura 4.2**; **Tabella 4.5**). Né la proporzione di tumori positivi né il *TERT index* erano significativamente diversi a seconda dell'istotipo.

L'attività replicativa è stata determinata mediante anticorpo MIB-1 in 22 casi per le ragioni riportate sopra. I nuclei dei mastociti marcati positivamente variavano dal 2 al 31.08% (MIB-1 *index* medio, 13.8%); l'attività replicativa era significativamente più elevata nei MCT pleomorfi (MIB-1 *index* medio, 25.4%) rispetto ai MCT ben differenziati (MIB-1 *index* medio, 9.5%) o atipici (MIB-1 *index* medio, 14.6%). Sono state evidenziate correlazioni tra attività replicativa e attività mitotica ($R = 0.835$; $P < 0.001$), attività proliferativa e *Kit* IS ($R = 0.669$; $P = 0.001$) e *Kit* IS e attività mitotica ($R = 0.646$; $P = 0.001$). Era inoltre presente una correlazione tra MIB-1 *index* e *TERT index* ($R = 0.442$; $P = 0.04$).

Decorso clinico

Le informazioni sulla gestione dei pazienti e sul decorso clinico erano disponibili per tutti i casi (**Tabella 4.3**). In 20 gatti (80%), il tumore era stato esciso con ampi margini; per 3 gatti con MCT disseminato sono stati asportati solo parte dei noduli (ID 3, 10, 19); in due casi i tumori non sono stati asportati (ID 9, 18). La recidiva locale e il coinvolgimento viscerale sono stati confermati istologicamente in 4 (16%; ID 6, 16,

Tabella 4.5 Parametri immunostochimici valutati in 25 mastocitomi cutanei di gatto raggruppati per istotipo.

Istotipo	Kit ^a				Kit IS Media (range)	hTERT ^a		MIB-1 ^a % media
	Negativi N. casi (%)	Membrana N. casi (%)	Citopl. focale N. casi (%)	Citopl. diffuso N. casi (%)		Positivi N. casi (%)	TERT index % media	
Mastocitico ben differenziato (n = 15; 60%)	4/15 (26.7%)	6/15 (40%)	4/15 (26.7%)	1/15 (6.6%)	3 (0-8)	8/14 (57.1%)	39%	9.5%
Mastocitico pleomorfo (n = 7; 28%)	0/7 (0%)	2/7 (28.6%)	5/7 (71.4%)	0/7 (0%)	8 (4-12)	4/5 (80%)	50.9%	25.4%
Atipico (n = 3; 12%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)	3 (2-4)	3/3 (100%)	49.2%	14.6%
Totale (n = 25)	4/25 (16%)	8/25 (32%)	11/25 (44%)	2/25 (8%)	4 (0-12)	15/22 (68.2%)	44.2%	13.8%

^a I sistemi di valutazione utilizzati per i diversi parametri sono elencati in **Tabella 4.1**.

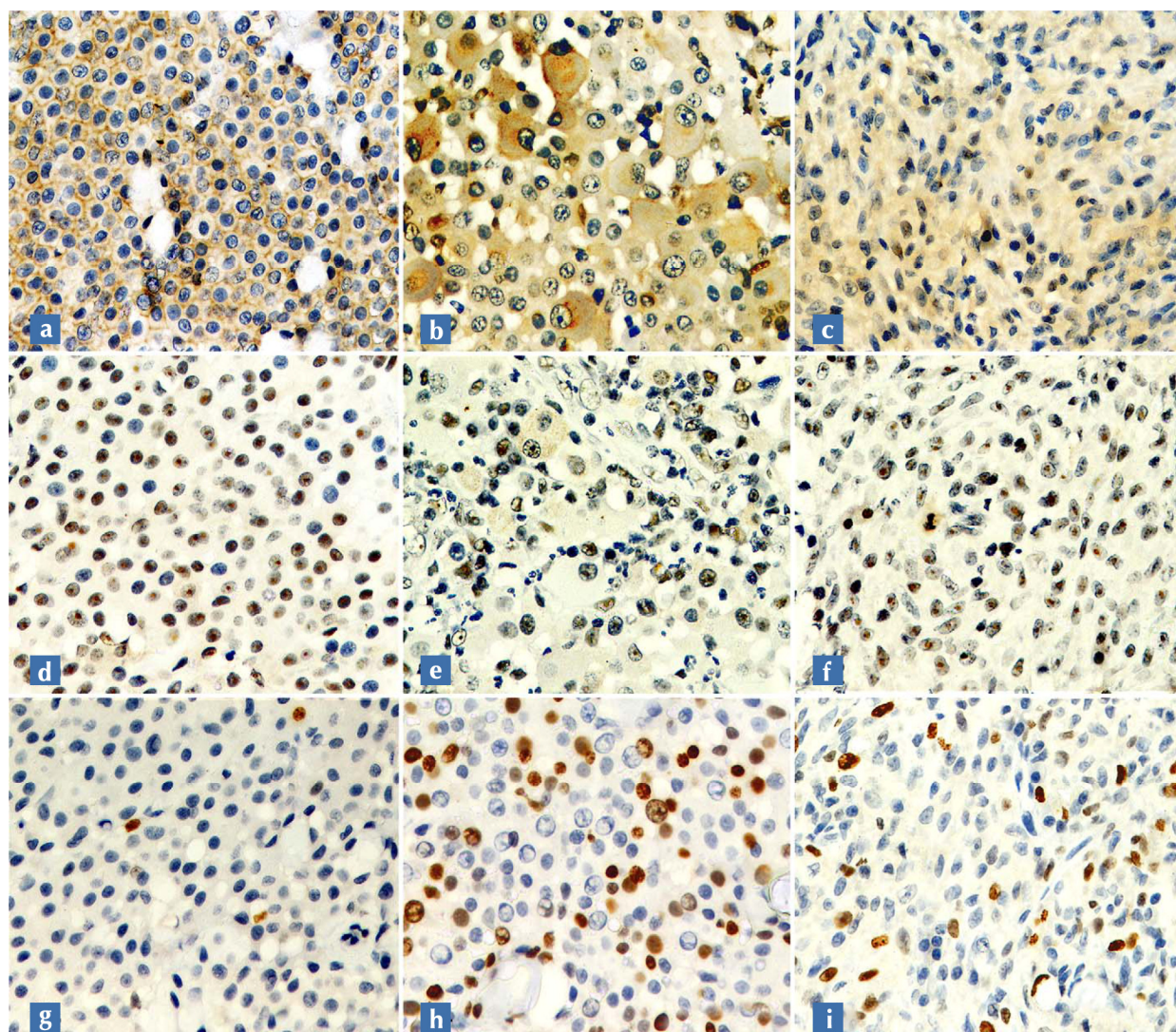


Figura 4.2 Gatto. Cute. Variabilità del pattern di espressione della proteina Kit da parte dei mastociti neoplastici. **(a)** Positività prevalentemente di membrana in un MCT ben differenziato. **(b)** Positività paranucleare in un MCT pleomorfo. **(c)** Positività citoplasmatica diffusa in un MCT atipici. Espressione immunoistochimica della proteina hTERT. **(d)** Intensa positività nucleare e nucleolare. **(e, f)** Positività prevalentemente nucleolare. Valutazione dell'attività proliferativa mediante dimostrazione immunoistochimica dell'Ag nucleare Ki67. **(g)** Attività proliferativa bassa in un mastocitoma ben differenziato (MIB-1 index = 2.68%). **(h, i)** Attività proliferativa elevata in un MCT pleomorfo (MIB-1 index = 27.26%) e in un MCT atipico (MIB-1 index = 21.93%). CD117 (a, b, c), hTERT (d, e, f) e MIB-1 (g, h, i), contrasto con Ematossilina di Papanicolau, 20x.

19, 24) e due casi (8%; ID 8, 12) rispettivamente. In altri due gatti (ID 3, 10) le metastasi viscerali sono state solo sospettate clinicamente. Nei 4 gatti con MCT disseminati (ID 3, 9, 10, 19) hanno continuato a insorgere nuovi noduli. Cinque gatti sono deceduti o sono stati soppressi a causa del MCT (20%; ID 3, 4, 8, 9, 10); due gatti (ID 11, 15) sono deceduti per altre cause prima del termine del periodo minimo di *follow-up* (24 mesi). Diciotto gatti (72%) erano in vita al termine del periodo di *follow-up*. Dei 5 gatti deceduti a causa del tumore, 3 (ID 3, 9, 10) avevano MCT disseminati, due dei quali con sospetto interessamento viscerale; i restanti due (ID 4, 8) avevano MCT singoli, ma sono deceduti poco tempo l'escissione chirurgica in seguito all'insorgenza di metastasi viscerali. Il tempo di sopravvivenza medio in quei 5 gatti è stato di 4 mesi (*range*, 1-6).

I parametri clinicopatologici valutati sono stati messi a confronto nel gruppo dei gatti deceduti rispetto a quello dei gatti ancora in vita (**Tabella 4.6**). Sono emerse differenze significative per molteplicità delle lesioni ($P = 0.02$), istotipo ($P = 0.012$), attività mitotica ($P = 0.002$), granuli citoplasmatici ($P = 0.033$), *Kit* IS ($P = 0.003$) e MIB-1 *index* ($P = 0.014$). Dei 5 gatti deceduti durante il periodo di *follow-up*, 4 avevano un MCT pleomorfo e uno un MCT atipico. Quei 5 casi erano caratterizzati da elevata attività mitotica (media, 17 per 10 CFI) e replicativa (media, 25.2%) e da una densità di granuli citoplasmatici da bassa a moderata. La positività per *Kit* era citoplasmatica focale nei 4 MCT pleomorfi e diffusa nel MCT atipico.

4.4 Discussione

In questo studio sono stati valutati diversi parametri istologici e immunoistochimici del mastocitoma cutaneo felino allo scopo di individuare le variabili correlate alla prognosi. Il venti per cento dei MCT di questo studio ha mostrato un comportamento biologico aggressivo, il che è coerente con quanto osservato in studi precedenti [Wilcock *et al.*, 1986; Buerger e Scott, 1987; Carpenter *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 2002; Lepri *et al.*, 2003; Litster e Sorenmo, 2006]. A differenza di quanto riferiscono altri autori [Garner e Lingeman, 1970; Buerger e Scott, 1987] non è stata rilevata in questo studio una prevalenza dei gatti maschi, essendo il rapporto M:F nettamente a favore del sesso femminile; il sesso non si è tuttavia dimostrato rilevante ai fini prognostici. Sempre in contrasto con la letteratura [Wilcock *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1991], l'unico esemplare di razza Siamese dello studio aveva sviluppato un MCT pleomorfo (in seguito al quale è deceduto) e non era in giovane età al momento della diagnosi. L'età media dei pazienti affetti da forme atipiche non era inoltre inferiore all'età media complessiva. I nostri risultati confermano invece la predilezione delle forme cutanee per la regione della testa e del collo riportata da altri autori [Macy e Reynolds, 1981; Buerger e Scott, 1987], essendo tale regione coinvolta in quasi la me-

Tabella 4.6 Parametri clinicopatologici in 23 mastocitomi cutanei di gatto raggruppati in base al decorso clinico

Parametri ^a	Gatti in vita a 24 m dalla diagnosi ^b (n = 18)	Gatti deceduti di MCT a 24 m dalla diagnosi ^b (n = 5)	P
Sesso			0.06
Maschi	9	0	
Femmine	9	5	
Età media (range)	8 (1 – 16) anni	10 (6 – 15) anni	0.451
Molteplicità^c			0.02
Singoli	17	2	
Disseminati	1	3	
Istotipo			0.012
<i>M. ben differenziato</i>	13	0	
<i>M. pleomorfo</i>	3	4	
<i>Atipico</i>	2	1	
Attività mitotica media (range)	4 (0 – 29)	17 (8 – 29)	0.002
Granuli citoplasmatici			0.033
1	2	1	
2	5	4	
3	11	0	
Granulociti eosinofili			0.385
0	9	1	
1	4	2	
2	1	1	
3	4	1	
Infiltrato linfocitario			0.559
0	8	1	
1	3	2	
2	4	1	
3	3	1	
Kit			0.068
Negativi	4	0	
Pos. membranosa	7	0	
Pos. citoplasmatica	7	5	
Kit IS medio (range)	4 (0 – 8)	9 (4 – 12)	0.003
hTERT			0.827
Negativi	6	1	
Positivi	11	3	
TERT index medio (range)	43.2% (10% – 87.4%)	50.7% (37.9% – 70.1%)	0.584
MIB-1 index medio (range)	11.2% (2% – 31.1%)	25.2% (21.9% – 27.9%)	0.014

^a I sistemi di valutazione utilizzati per i diversi parametri sono elencati in **Tabella 4.1**.

^b Due gatti (N. 11 e 15) sono stati esclusi dall'analisi dei fattori prognostici in quanto deceduti per altre cause prima del termine del periodo minimo di *follow-up*.

^c Singoli = presenza di un nodulo solo o di due noduli tra loro distanti; disseminati = elevato numero di noduli distribuiti su tutta la superficie corporea.

tà dei casi. Tuttavia il numero di casi valutati non può essere considerato sufficiente per estrapolare dati attendibili da un punto di vista epidemiologico.

Secondo uno studio, gatti con noduli singoli sopravvivrebbero più a lungo dei gatti con noduli multipli (cinque o più) [Litster e Sorenmo, 2006]. Anche nel nostro caso il 75% dei gatti con MCT disseminato ha avuto un esito sfavorevole, contro il 10% dei gatti con MCT singoli.

Come atteso, gran parte dei MCT in questo studio erano mastocitici ben differenziati. Nel sistema di *grading* istologico proposto da Patnaik (1984), il grado di anaplasia risulta prognosticamente attendibile e correlato ai tempi di sopravvivenza nel cane. Nel gatto una correlazione di questo tipo non è mai stata dimostrata [Buerger e Scott, 1987; Molander-Mc-Crary *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002], e in uno studio l'esito dei MCT pleomorfi felini appariva generalmente buono [Johnson *et al.*, 2002]. In questo studio tuttavia i MCT pleomorfi mostravano un'attività mitotica più elevata ed erano associati a una prognosi sfavorevole, mentre nessuno dei gatti con MCT ben differenziato è deceduto a causa del tumore. Inoltre uno dei 3 MCT atipici, che sono in genere considerati benigni, era caratterizzato da un'elevata attività proliferativa e il gatto è stato sottoposto a eutanasia a 6 mesi dalla diagnosi per interessamento viscerale. Di conseguenza si raccomanda attenzione nella gestione dei MCT cutanei che non appaiono ben differenziati all'esame istologico.

La perdita di differenziazione da parte dei mastociti neoplastici era generalmente accompagnata da una ridotta densità di granuli citoplasmatici, che era correlata a una prognosi peggiore. La tendenza dei granuli a dare una reazione ortocromatica anziché metacromatica è stata in precedenza riportata da altri autori ed è stata interpretata come un segno di anaplasia [Wilcock *et al.*, 1986; Pulley e Stannard, 1990; Gross *et al.*, 2005]. L'intensità della reazione metacromatica al blu di toluidina tende ad essere direttamente proporzionale al grado di differenziazione cellulare, a conferma del fatto che nei MCT atipici e pleomorfi i *granuli intracitoplasmatici* sono significativamente inferiori per numero e dimensione. Una colorazione debole infatti riflette una minor produzione o l'incapacità di accumulo di quelle sostanze (*eparina* e altri glicosaminoglicani) che sono in grado di interagire con i coloranti istochimici [Simoes e Schoening, 1994]. La preservazione dei GAG è fortemente dipendente anche dal fissativo impiegato e dalle modalità di processazione del campione istologico, tuttavia la significatività dei risultati ottenuti suggerisce che il grado di differenziazione cellulare rappresenti il principale fattore discriminante.

Come confermano i nostri dati, a differenza del cane, nelle forme tipiche di mastocitoma felino i *granulociti eosinofili* infiltranti sono generalmente un riscontro sporadico, mentre tendono ad essere più rappresentati nei MCT pleomorfi e abbondanti nei MCT atipici [Wilcock *et al.*, 1986; Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005; Thamm e Vail, 2007]. Nonostante la presenza di eosinofili non fosse correlata alla prognosi, potrebbe avere un'importanza diagnostica, specie se abbinata alla dimostrazione istochimica dei granuli citoplasmatici, nel distinguere i MCT atipici da di-

sordini istiocitari o da sarcomi poco differenziati.

Nel mastocitoma felino è frequentemente riferita la presenza di *noduli linfocitari* [Holzinger, 1973; Buerger e Scott, 1987; Johnson *et al.*, 2002]. In uno studio è riportato che nessuno dei gatti con tumori che mostravano infiltrati linfocitari sviluppavano nuove lesioni [Buerger e Scott, 1987]. Aggregati linfoidi sono spesso presenti anche in altre neoplasie dei piccoli animali e sono talora associati a una regressione spontanea di particolari tipi di tumori benigni (es. istiocitoma cutaneo benigno) e si ritrovano in malattie cutanee del gatto, tra cui il complesso del granuloma eosinofilo [Muller *et al.*, 1983] ed è possibile che riflettano una risposta immunitaria dell'organismo nei confronti della lesione. In questo studio sono stati evidenziati aggregati di piccoli linfociti in quantità variabile nel 60% dei campioni, soprattutto nei MCT atipici, con tendenza sia a formare manicotti perivascolari che ad infiltrare le lamine di mastociti neoplastici, ma non sono emerse implicazioni prognostiche.

Diversi autori sono concordi nel considerare l'indice mitotico l'unico fattore prognosticamente predittivo nel MCT felino [Johnson *et al.*, 2002; Lepri *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2005]. Nel presente studio l'*attività mitotica* è risultata avere la più forte correlazione con la prognosi. L'attività proliferativa è stata valutata anche mediante tecniche immunostochimica, ricercando l'anticorpo MIB-1, che, rilevando un antigene espresso durante tutte le fasi attive del ciclo (la proteina nucleare *Ki67*), permette di quantificare la frazione cellulare proliferante con un livello di accuratezza superiore rispetto al conteggio delle mitosi. Entrambi i parametri erano significativamente più elevati nei MCT pleomorfi e nei casi ad esito sfavorevole. Inoltre la correlazione tra i due parametri era forte, a suggerire che le stesse informazioni possano essere ottenute limitandosi al semplice conteggio delle mitosi.

La *proteina Kit* è una molecola recettoriale di membrana appartenente alla famiglia delle *tirosinchinasi*, codificata dal *proto-oncogene c-Kit*. L'interazione tra il recettore *Kit* e il suo ligando specifico SCF (*stem cell factor*, fattore di crescita mastocitario), promuove la proliferazione cellulare e sembra implicata nei meccanismi di differenziazione maturativa delle cellule staminali pluripotenziali; *Kit* gioca inoltre un ruolo chiave nei processi di sviluppo fetale e la sua espressione nella vita postnatale è mantenuta essenzialmente da cellule staminali emopoietiche, mastociti, linfociti intraepiteliali, cellule germinali, melanociti e cellule intersiziali di *Cajal* [Miettinen e Lasota, 2001].

Mutazioni genomiche attivanti di *c-Kit* sono state identificate nel mastocitoma del cane. Più nello specifico, *internal tandem duplication* (ITD), delezioni e mutazioni puntiformi a carico del dominio juxtamembranario del proto-oncogene sono state documentate nel 30-50% dei mastocitomi canini di II e III grado [Zemke *et al.*, 2002] e risulterebbero direttamente implicate nella patogenesi del processo neoplastico [London *et al.*, 1999; Zemke *et al.*, 2001]. Tali mutazioni indurrebbero infatti un'acquisizione di funzione da parte del gene, che determinerebbe la fosforilazione costitutiva del recettore in assenza di ligando, cui farebbe seguito una proliferazione cellulare incontrollata [Zemke *et al.*, 2001]. Sempre nel cane è stata dimostrata una correlazione statisticamente significati-

va tra mutazioni, grado istologico elevato e prognosi sfavorevole. Le mutazioni sono spesso associate a una aberrante espressione di *Kit* da parte dei mastociti neoplastici, localizzata a livello paranucleare o citoplasmatica diffusa, anziché confinata alla membrana cellulare, come accade nei MC non neoplastici. L'espressione citoplasmatica di CD117 sembra a sua volta correlarsi ad un più elevato grado istologico e a una prognosi peggiore [Webster *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2007].

L'espressione di *Kit* nel mastocitoma gatto è già stata segnalata da altri autori [Rodriguez-Carino *et al.*, 2009]. In uno studio, l'espressione citoplasmatica di *Kit* è stata evidenziata in 18 di 27 (67%) mastocitomi cutanei, senza correlazione con l'istotipo [Rodriguez-Carino *et al.*, 2009]. Tuttavia gli autori non mettevano in relazione l'espressione di *Kit* con l'attività proliferativa dei tumori o con la prognosi. In questo studio, il 52% dei tumori presentava un'espressione aberrante (citoplasmatica) di *Kit*, senza correlazione con l'istotipo. La positività è stata graduata tenendo conto sia dell'intensità del segnale che della frazione di cellule positive (*Kit* IS) ed è risultata correlata con l'attività mitotica e il MIB-1 *index* e con una prognosi sfavorevole. L'espressione di *Kit* merita ulteriori approfondimenti sia come indicatore prognostico che come potenziale *target* di terapie con inibitori tirosinchinasici.

La *telomerasi* è un enzima polimerasico ribonucleoproteico costituito da una componente a RNA (RT) e da un complesso multiproteico, che comprende una subunità ad azione trascrittasi inversa (TERT). L'attività della telomerasi è considerata essenziale per la conservazione delle estremità dei cromosomi, in quanto è in grado di aggiungere sequenze nucleotidiche TTAGGG ai telomeri e prolungare così la sopravvivenza cellulare [Morin, 1989]. L'attività telomerasica è fisiologicamente rilevabile nelle cellule emopoietiche e nelle cellule germinali in continua replicazione, ma non nelle cellule somatiche differenziate. È stata inoltre riscontrata nelle linee cellulari immortali e nella maggior parte delle neoplasie maligne dell'uomo, il che fa attualmente considerare l'attività telomerasica un fattore cruciale nei fenomeni di cancerogenesi e di immortalizzazione delle cellule neoplastiche [Kim *et al.*, 1994]. Recenti studi hanno dimostrato l'analogia strutturale tra la proteina TERT dell'uomo e quella di cane e di gatto e pertanto la possibilità di utilizzare in campo veterinario gli stessi kit diagnostici impiegati per l'uomo [Biller *et al.*, 1998; Nasir *et al.*, 2008]; una sovraespressione della proteina TERT è stata così evidenziata anche in diverse neoplasie maligne animali [Yazawa *et al.*, 1999; Carioto *et al.*, 2001; Funakoshi *et al.*, 2000; Mandrioli *et al.*, 2007].

I precursori dei MC, inizialmente in grado di esprimere la proteina TERT, tendono progressivamente a perdere tale abilità nel corso dei processi di differenziazione maturativa, al contrario ricerche effettuate su linee cellulari di MCT umano hanno rilevato un'attività telomerasica persistentemente elevata durante tutto il ciclo cellulare, completamente svincolata dai segnali mediati dai fattori di crescita [Chaves-Dias *et al.*, 2001].

La positività per *hTERT* evidenziata in questo studio nel 68% dei campioni di MCT e la grande variabilità di espressione da caso a caso suggeriscono che l'attivazione della telomerasi possa giocare un ruolo importante anche nella progres-

sione di alcune forme di mastocitoma e dunque assumere una valenza prognostica. Nei casi studiati non è risultata evidente alcuna correlazione tra espressione di *hTERT* ed espressione di *Kit* o con la prognosi, e una debole correlazione con il MIB-1 *index*; a supporto dell'ipotesi che l'attivazione della telomerasi avvenga indipendentemente dal segnale di proliferazione. Tale ipotesi è avvalorata dall'osservazione *in vitro* che l'attività telomerasica nelle colture cellulari di MCT si mantiene elevata anche dopo il trattamento con inibitori della proliferazione cellulare [Chaves-Dias *et al.*, 2001].

4.5 Conclusioni

I risultati di questo studio pongono l'accento sul valore prognostico dell'attività proliferativa e in particolare dell'indice mitotico, nel mastocitoma cutaneo felino. Oltre all'indice mitotico, altri parametri istologici e molecolari sono risultati correlati alla prognosi. Futuri studi prospettivi su popolazioni più ampie dovrebbero valutare se la molteplicità delle lesioni, l'istotipo, il livello di espressione della proteina *Kit* sono potenzialmente utili nell'identificare quali casi di MCT felino sono più predisposti ad avere un comportamento biologico aggressivo e di conseguenza necessitano di un monitoraggio più attento.

L'evidenza infine di una delocalizzazione della proteina *Kit* e di attività telomerasica in una significativa proporzione di tumori mette in luce le potenzialità di approcci terapeutici che prevedano l'inibizione mirata di queste vie.

Bibliografia

- Biller BJ, Kitchell BE, Casey DC. Evaluation of an assay for detecting telomerase activity in neoplastic tissues of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1998; **59**: 1526–1529.
- Burger RG, Scott DW. Cutaneous mast cell neoplasia in cats: 14 cases (1975-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1987; **190**: 1440-1444.
- Carioto LM, Kruth SA, Betts DH, King WA. Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *American Journal of Veterinary Research* 2001; **62**: 1442-1446.
- Carpenter JL, Andrews LK, Holzworth J. Tumors and tumor-like lesions. In: *Diseases of the Cat, Medicine and Surgery*, ed. Holzworth J, WB Saunders, Philadelphia, PA, USA, 1987: 569-579.
- Chastain CB, Turk MA, O'Brien D. Benign cutaneous mastocytomas in two litters of Siamese kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1988; **193**: 959-960.
- Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM, *et al.* Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines. *Journal of Immunology* 2001; **166**: 6647-6656.
- Funakoshi Y., Nakayama H., Uetsuka K., *et al.* Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology* 2000; **37**: 177–183.
- Garner FM, Lingeman CH. Mast-cell neoplasms of the domestic cat. *Pathologia Veterinaria* 1970; **7**: 517-530.
- Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Mast cell tumor. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed. Meuten DJ, 4th ed., Iowa State Press, Ames, IA, USA, 2002: 107.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2nd ed., Blackwell Science LTD, Oxford, UK, 2005: 858-861.
- Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. Mast cell tumors. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*, 2nd series, ed. Schulman FY, p. 28. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA, 1998.
- Holzinger EA. Feline cutaneous mastocytomas. *Cornell Vet* 1973; **63**: 87-93.
- Isotani M, Tamura K, Yagihara H, *et al.* Identification of a c-Kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Veterinary Immunology and*

- Immunopathology* 2006; **114**: 168-172.
- Johnson TO, Schulman FY, Lipscomb TP, Yantis LD. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. *Veterinary Pathology* 2002; **39**: 452-457.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011-2015.
- Lepri E, Ricci G, Leonardi L, Sforza M, Mechelli L. Diagnostic and prognostic features of feline cutaneous mast cell tumours: a retrospective analysis of 40 cases. *Veterinary Research Communication* 2003; **27**: 707-709.
- Litster AL, Sorenmo KU. Characterisation of signalment, clinical and survival characteristics of 41 cats with mast cell neoplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2006; **8**: 177-183.
- London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 1999; **27**: 689-697.
- Macy DW, Reynolds HA. The incidence, characteristics and clinical management of skin tumors in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1981; **17**: 1026-1034.
- Mandrioli L, Panarese S, Cesari A, Mandara MT, Marcato PS, Bettini G. Immunohistochemical expression of h-telomerase reverse transcriptase in canine and feline meningiomas. *Journal of Veterinary Science* 2007; **8**: 111-115.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors - clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archive* 2001; **438**: 1-12.
- Miller MA, Nelson SL, Turk JR, *et al.* Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Veterinary Pathology* 1991; **28**: 389-395.
- Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K, Tyler JW, Buss MS: Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1998; **34**: 281-284.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; **59**: 521-529.
- Muller GH, Kirk RW, Scott DW. *Small animal dermatology III*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1983; **74**: 751-757.
- Nasir L. Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs. *Veterinary Journal* 2008; **175**: 155-163.
- Oligivie GK, Moore AS. *Feline Oncology*, Veterinary Learning System, Trenton, NJ, USA, 2001: 407-412.
- Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 1984; **21**: 469-474.
- Pulley LT, Stannard AA. *Tumors of the skin and soft tissues*. In: Tumors of Domestic Animals, ed. Moulton JE, 3rd ed., University of California Press, Davis, 1990: 43.
- Rodriguez-Cariño C, Fondevila D, Segales J, Rabanal R. Expression of KIT receptor

- in feline cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 878-883.
- Simoes JP, Schoning P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1994; **6**: 458-465.
- Thamm DH, Vail DM. Mast cell tumors. In: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Ed Saunders WB, 4th ed., Philadelphia, PA, USA, 2007: 416-420.
- Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2004; **41**: 371-377.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 2007; **44**: 298-308.
- Wilcock BP, Yager JA, Zink MC. The morphology and behavior of feline cutaneous mastocytomas. *Veterinary Pathology* 1986; **23**: 320-324.
- Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, et al. Measurement of telomerase activity in dog tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 1999; **61**: 1125-1129.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-kit. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2001; **13**: 341-345.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology* 2002; **39**: 529-535.

Pubblicazioni scientifiche derivate da questo studio:

- “Prognostic value of histologic and immunohistochemical features in feline cutaneous mast cell tumors”. **Sabattini S**, Bettini G. *Veterinary Pathology* 2010; 47(4): 643-53.
- “Immunohistochemical prognosticators in feline cutaneous and visceral mast cell tumors”. **Sabattini S**, Bettini G, Post GS. *Proceedings of the 2009 Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology (ESVONC)*; p 65; 27-29 March 2009, Visegrád, Hungary.
- “Indicatori istopatologici di prognosi nel mastocitoma cutaneo e viscerale del gatto”. **Sabattini S**, Bettini G. *Proceedings of the VI National Congress of the Italian Society of Veterinary Pathology (AIPVet)*; pp 26-33; 15-16 May 2009, Naples, Italy.

Significato prognostico delle disregolazioni di *Kit* nel mastocitoma cutaneo felino

5.1 Introduzione

I mastocitomi (MCT) rappresentano il 15-21% di tutte le neoplasie cutanee feline [Miller *et al.*, 1991; Ogilvie e Moore, 2001]. Nonostante le caratteristiche cliniche e istologiche siano ben descritte, il comportamento biologico di questo tumore nel gatto è tuttora controverso.

Parecchi autori sono concordi nel considerare il MCT cutaneo felino un tumore benigno, nonostante la tendenza alla recidiva locale o all'insorgenza multicentrica, ma in quasi tutti gli studi è riportata una percentuale variabile di casi ad esito sfavorevole (**Tabella 5.1**). Recentemente si è visto come i MCT cutanei multipli possano essere associati alla presenza di MCT splenico, condizione legata a una prognosi peggiore [Litster e Sorenmo, 2006]. Tuttavia, anche gatti con noduli singoli possono sviluppare successivamente lesioni cutanee multiple, con o senza coinvolgimento splenico [Crafts e Pulley, 1975; Brown e Chalmers, 1990; Ogilvie e Moore, 2001; Litster e Sorenmo, 2006]. Riguardo alla concomitante presenza di MCT cutaneo e viscerale (*i.e.*, *mastocitosi sistemica*, MS) e su quale sia la localizzazione primitiva prevalente vi sono ancora molte perplessità. In studi effettuati sul MCT cutaneo felino, la MS era presente con una frequenza compresa tra 0 e 44% (**Tabella 5.1**). Alcuni autori hanno descritto casi di MS in cui il MCT splenico ha preceduto le lesioni cutanee [Allan *et al.*, 2000; Litster e Sorenmo, 2006], mentre altri riportano la cute come sede di insorgenza primitiva [Guerre *et al.*, 1979; Gullledge e Boos, 1997; Litster e Sorenmo, 2006; Lamm *et al.*, 2009]. D'altra parte il MCT viscerale può talvolta avere un decorso lungamente asintomatico, ed essere diagnosticato solo in seguito alla comparsa delle lesioni cutanee [Ogilvie e Moore, 2001]. In ogni caso, il breve periodo di tempo che intercorre generalmente tra la diagnosi

Tabella 5.1 *Rassegna dei principali studi riguardanti presentazione clinica e comportamento biologico del mastocitoma cutaneo felino.*

	N. MCT cutanei	Tumori multipli	Recidive/nuove insorgenze cutanee	Coinvolgimento viscerale	Deceduti
Nielsen, 1969	18	28%	NA	44%	NA
Garner e Lingeman, 1970	10	20%	NA	10%	NA
Holzinger, 1973	32	NA	56%	3%	NA
Wilcock <i>et al.</i> , 1986	42	7%	12%	7%	7%
Buerger e Scott, 1987	14	43%	36%	0%	NA
Molander-McCrary <i>et al.</i> , 1998	32	12%	13 – 19%	0%	0%
Johnson <i>et al.</i> , 2001	14	14%	22%	NA	7%
Lepri <i>et al.</i> , 2003	30	6%	39%	3%	6%
Litster e Sorenmo, 2006	33	30%	12%	9%	24%
Sabattini e Bettini, 2010	25	16%	16%	8%	20%

di MCT cutanei multipli e di MCT splenico rende l'identificazione del tumore primitivo particolarmente problematica nella pratica clinica.

Recentemente si è osservato come anche i MCT cutanei multipli (cinque o più noduli) in assenza di coinvolgimento viscerale sarebbero associati a una prognosi peggiore [Litster e Sorenmo, 2006].

Per finire, molti studi indicano che le caratteristiche istologiche solitamente associate alla malignità, come il pleomorfismo o un *pattern* di crescita infiltrante, non sarebbero legate al comportamento biologico nel MCT felino, con l'unica eccezione dell'attività mitotica. Quindi al momento non esiste un *grading* istologico per questo tumore [Buerger e Scott, 1987; Molander-McCrary *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002].

Per tutte queste ragioni, l'identificazione dei MCT cutanei felini a comportamento potenzialmente maligno rimane una sfida e c'è la necessità di trovare metodi per individuare questi tumori al momento della diagnosi.

In seguito ai promettenti risultati ottenuti nel cane, l'interesse scientifico si sta focalizzando sul ruolo biologico del recettore tirosinchinasico *Kit* anche nel MCT



Figura 5.1 Immagini rappresentative di mastocitoma cutaneo felino nella regione della testa. Le lesioni interessano più frequentemente la pinna auricolare, la regione temporale, il planum nasale e la regione periorbitale; possono presentarsi come lesioni singole o multiple, di dimensioni variabili da pochi millimetri a qualche centimetro (Gentile concessione della prof.ssa O. Capitani e del dott. G. Pisani).

felino. Un'aberrante espressione citoplasmatica di *Kit* all'immunoistochimica è stata riportata in 18 di 27 (67%) e in 13 di 25 casi (52%), rispettivamente [Rodriguez-Cariño *et al.*, 2009; Sabattini e Bettini, 2010], mentre mutazioni del proto-oncogene *c-Kit* a livello del quinto dominio *simil-immunoglobulinico* sono state identificate nel 68% dei casi [Isotani *et al.*, 2010]. Gli stessi autori hanno riscontrato una risposta da completa a parziale al trattamento con *Kit*-inibitori in 7 di 8 gatti [Isotani *et al.*, 2010].

Si è ipotizzato che il mastocitoma felino abbia un meccanismo patogenetico simile a quello del cane, ma finora non è stata verificata l'associazione tra delocalizzazione del recettore e presenza di mutazioni geniche, analogamente a quanto avviene nel cane, né il significato prognostico di tali mutazioni. Una migliore comprensione del ruolo della disregolazione di *Kit* nel MCT del gatto potrebbe pertanto fornire informazioni potenzialmente utili all'identificazione dei tumori a comportamento maligno e allo stesso tempo mettere in luce nuove opportunità di intervento terapeutico.

Questo studio è stato condotto allo scopo di caratterizzare le anomalie del recettore *Kit* (citocalizzazione aberrante, sovra espressione proteica e mutazioni geniche) in una casistica di MCT cutanei di gatto a comportamento biologico variabile. Nello specifico i nostri obiettivi erano (1) stabilire se l'espressione citoplasmatica di *Kit* potesse essere considerata indicativa della presenza di mutazioni, come avviene nel cane; (2) valutare il rapporto tra disregolazioni di *Kit* e presentazione clinica, decorso, sopravvivenza e attività mitotica dei tumori, allo scopo di definirne l'utilità prognostica.

5.2 Materiali e Metodi

Criteri di selezione e informazioni cliniche

Sono state esaminate le schede cliniche di gatti con diagnosi di mastocitoma cutaneo riferiti al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DSMVet), Università di Bologna, da Gennaio 2005 a Dicembre 2010. I criteri di selezione sono stati una diagnosi istologica di MCT cutaneo (uno o più noduli concomitanti) e la possibilità di ottenere informazioni sul decorso clinico della malattia e sull'esito finale.

Per tutti i casi sono state acquisite dal database del Dipartimento informazioni riguardanti il segnalamento, la localizzazione e distribuzione delle lesioni cutanee al momento della diagnosi e la dimensione dei tumori.

Sono state inoltre ottenute informazioni riguardanti il tipo di trattamento ricevuto: *escissione chirurgica completa* (exeresi di tutte le lesioni cutanee con margini indenni) o *parziale* (exeresi di uno o più noduli con margini infiltrati o exeresi solo di alcuni noduli) e somministrazione di terapie adiuvanti.

Tabella 5.2 Segnalamento, presentazione clinica e decorso di 22 gatti con mastocitoma cutaneo.

ID	Razza	Sesso ^a	Età (anni)	Localizzazione e distribuzione alla diagnosi (dim. ^b)	Trattamento	Decorso ^c	PFS (giorni)	N. lesioni cutanee ^d	Esito ^e	OS (giorni)	Noduli campionati
1	Europeo	Mc	10	nodulo singolo, arto anteriore (6 mm)	exeresi completa	RC	1796	MCT solitario	altro	1796	1
2	Europeo	Fs	10	10 – 15 noduli disseminati (22 mm)	exeresi parziale	MP	13	MCT disseminato	deceduto	181	2 (concomitanti)
3	Europeo	F	8	nodulo singolo, pinna auricolare (12 mm)	chirurgia; corticosteroidi	MP	102	MCT disseminato	deceduto	386	2 (concomitanti)
4	Europeo	Mc	10	due noduli, regione temporale e dorso (32 mm)	chirurgia; corticosteroidi	RC	1463	MCT solitario	altro	1463	2 (concomitanti)
5	Europeo	Mc	4	nodulo singolo, palpebra superiore (3 mm)	exeresi completa	RC	1825	MCT solitario	in vita	1825	1
6	Europeo	Fs	10	15 – 20 noduli disseminati (16 mm)	exeresi parziale; corticosteroidi	MP	22	MCT disseminato	deceduto	183	2 (concomitanti)
7	Incrocio Siamese	Fs	15	nodulo singolo, testa (20 mm)	exeresi parziale	MP	18	MCT disseminato	deceduto	156	1
8	Europeo	Fs	10	nodulo singolo, regione frontale (10 mm)	exeresi completa	RC	1504	MCT solitario	in vita	1504	1
9	Europeo	Mc	6	una decina di noduli disseminati, testa e arti, (9 mm)	exeresi parziale; corticosteroidi	MP	78	MCT disseminato	perso	778	1
10	Europeo	Fs	12	due noduli, sterno e arto posteriore (14 mm)	exeresi completa; corticosteroidi	MP	555	MCT disseminato	deceduto	616	2 (concomitanti)
11	Europeo	Fs	15	nodulo singolo, regione temporale (11 mm)	exeresi completa; corticosteroidi	MP	520	MCT solitario	in vita	1207	1
12	Europeo	Fs	8	nodulo singolo, regione lombare (26 mm)	exeresi completa; corticosteroidi	MP	64	MCT disseminato	deceduto	109	1
13	Europeo	Fs	5	nodulo singolo, pinna auricolare (3 mm)	exeresi completa	RC	662	MCT solitario	in vita	662	1
14	Europeo	Fs	12	nodulo singolo, arto posteriore (12 mm)	exeresi completa	RC	618	MCT solitario	in vita	618	1
15	Europeo	Fs	15	due noduli, regione interscapolare (18 mm)	exeresi completa, <i>masitinib</i>	MP	223	MCT disseminato	deceduto	588	2 (non concomitanti)
16	Europeo	Mc	2	due noduli, pinna auricolare e collo (9 mm)	exeresi completa; corticosteroidi	MP	11	MCT solitario	in vita	389	2 (non concomitanti)
17	Europeo	Mc	11	nodulo singolo, regione interscapolare (5 mm)	exeresi completa; corticosteroidi	RC	375	MCT solitario	in vita	375	1
18	Europeo	Mc	4	due noduli, regione ascellare e arto anteriore (10 mm)	exeresi completa	MP	28	MCT disseminato	deceduto	48	1
19	Met. pelo lungo	Mc	7	nodulo singolo, pinna auricolare (4 mm)	exeresi completa	RC	390	MCT solitario	in vita	390	1
20	Europeo	Fs	6	nodulo singolo, pinna auricolare (3 mm)	exeresi completa	RC	386	MCT solitario	in vita	386	1
21	Europeo	Mc	9	sei noduli, <i>planum</i> nasale, labbro, regione retroauricolare, fianchi (5 mm)	exeresi parziale	MP	110	MCT disseminato	in vita	397	3 (concomitanti)
22	Europeo	Fs	5	nodulo singolo, pinna auricolare (9 mm)	chirurgia	RC	382	MCT solitario	in vita	382	1

^a M = maschio; F = femmina; Mc = maschio castrato; Fs = femmina sterilizzata.

^b Diametro maggiore del nodulo di dimensioni maggiori.

^c RC = remissione completa; MP = malattia progressiva.

^d Numero di lesioni cutanee insorte durante il periodo di osservazione; MCT solitario = < 5 noduli concomitanti; MCT disseminato = ≥ 5 noduli concomitanti.

^e Altro = deceduto per altre cause dopo il periodo minimo di osservazione; perso = perso al *follow-up* dopo il periodo minimo di osservazione.

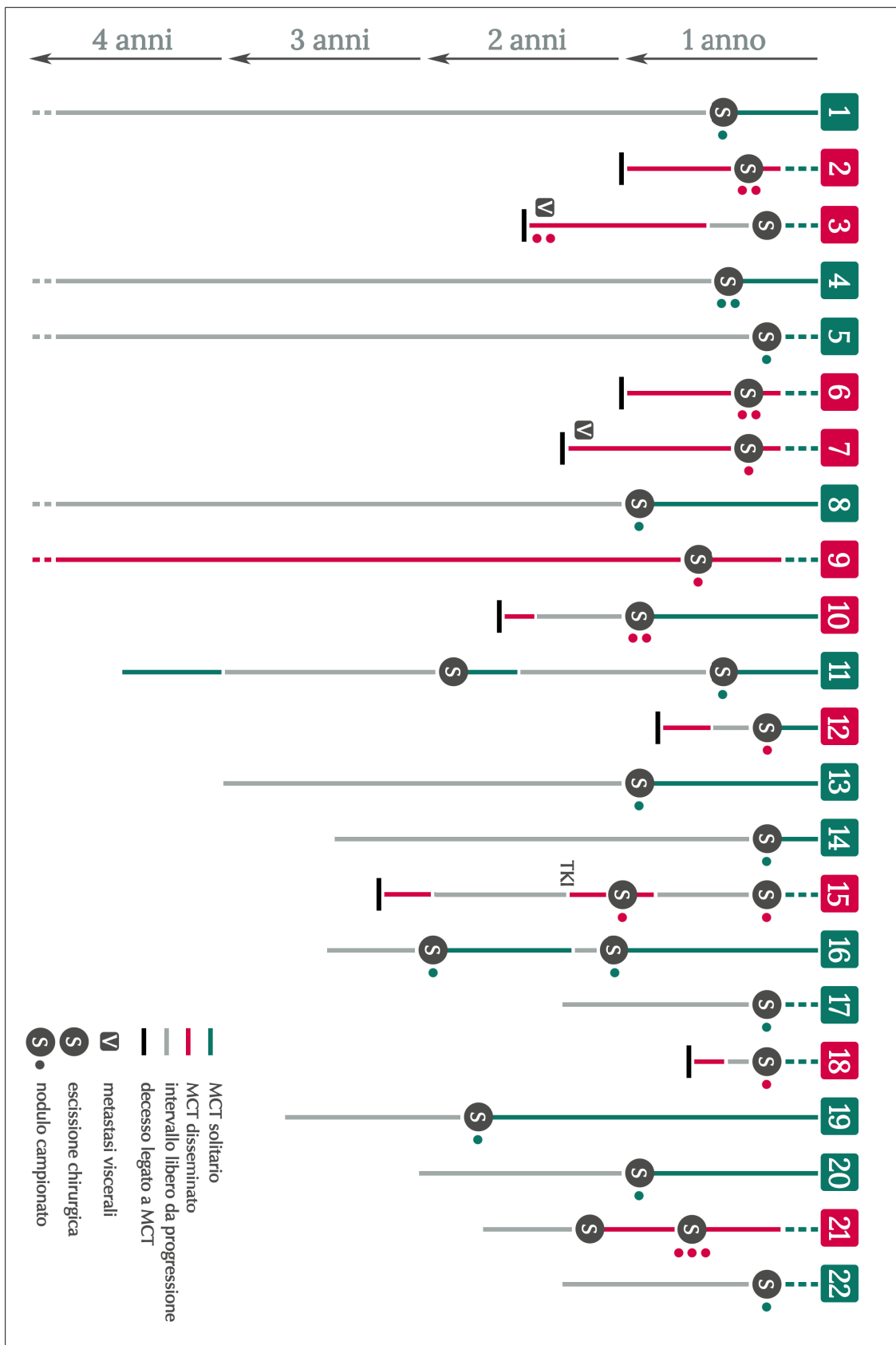


Figura 5.2 *Rappresentazione schematica del decorso clinico di 22 casi di mastocitoma cutaneo felino.*

Le notizie sul decorso clinico sono state raccolte mediante questionari *online* o interviste telefoniche con i veterinari referenti o i proprietari dell'animale. Il periodo di osservazione minimo richiesto per l'inclusione nello studio è stato di 12 mesi. In base alle informazioni ottenute, i casi sono stati suddivisi in due categorie: quelli andati incontro a *remissione completa* (RC) dopo terapia e quelli con *malattia progressiva* (MP). In base al numero di lesioni cutanee presenti alla diagnosi e di quelle complessivamente insorte durante il periodo di osservazione, i casi sono stati inoltre classificati secondo uno studio precedente in MCT *solitari* (meno di 5 noduli concomitanti) e MCT *disseminati* (5 o più noduli concomitanti) [Litster e Sorenmo, 2006]. Sono state raccolte anche informazioni relative alla presenza o assenza di interessamento viscerale, quando disponibili. L'intervallo libero da progressione (*progression free survival*, PFS) è stato definito come il tempo (in giorni) intercorso dalla data della diagnosi all'insorgenza di recidiva locale, di nuovi MCT cutanei o di metastasi viscerali/linfonodali. Si è scelto di mantenere anche i casi in cui non fosse presente una conferma citologica o istologica della ricomparsa della malattia, al fine di non condizionare i risultati includendo prevalentemente MCT in remissione completa. La sopravvivenza complessiva (*overall survival*, OS) è stata definita come il tempo (in giorni) dalla data della diagnosi fino all'ultimo giorno noto in cui l'animale era in vita. Al termine del periodo di osservazione (Dicembre 2011), in base all'esito clinico, i pazienti sono stati classificati come (1) in vita, (2) deceduti per cause estranee al MCT, (3) deceduti a causa del MCT, (4) persi al *follow-up*.

Per ciascun caso sono stati estratti dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica (DSMVet) i campioni (fissati in formalina e inclusi in paraffina) di almeno un nodulo da sottoporre a esame istologico, immunoistochimico e mutazionale. In caso di lesioni multiple, concomitanti o meno, sono stati esaminati tutti i noduli per i quali fosse disponibile materiale istologico, al fine di valutare eventuali differenze dal punto di vista molecolare.

Esame istologico

Dai campioni disponibili sono state allestite sezioni istologiche colorate con *ematossilina-eosina* (EE) e *blu di toluidina* per la conferma della diagnosi. Per ciascun nodulo è stata inoltre valutata l'attività mitotica, contando il numero complessivo di figure mitotiche presenti in 10 campi a forte ingrandimento (CFI, 400x) (*indice mitotico*, IM). Per la stima dell'IM sono state scelte nelle sezioni istologiche le aree a maggiore attività mitotica.

Espressione immunoistochimica di Kit

Ulteriori sezioni sono state sottoposte a esame immunoistochimico (IIC) per la determinazione della proteina *Kit*.

Per la rivelazione della reazione immunoistochimica è stata impiegata la tecnica *streptavidina-biotina-perossidasi*, utilizzando un kit commerciale (Dako LSAB™, Glostrup, Danimarca). Dopo incubazione con *perossido di idrogeno* allo 0.3% in metanolo per 20 minuti per bloccare l'attività delle *perossidasi endogene* e

pretrattamento in forno a microonde (750W, due cicli di 5 minuti) in tampone citrato a pH 6.0 per la riesposizione dell'antigene, le sezioni sono state incubate per una notte a 4°C in camera umida con l'anticorpo primario (*Dako CD117, polyclonal rabbit anti-human*) diluito 1:100 in PBS (0.01 M; pH 7.4). Quindi, previo lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate dapprima con l'anticorpo secondario (IgG *anti-rabbit* coniugato con biotina) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con il complesso streptavidina-perossidasi per 25 minuti a temperatura ambiente. Dopo un passaggio di 12 minuti nella soluzione cromogena DAB (*diaminobenzidina* 0.02% e H₂O₂ 0.001% in PBS), sono state risciacquate in PBS e quindi in acqua corrente, colorate con una colorazione di contrasto (*ematossilina di Papanicolau*), deidratate e montate con DPX™ (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Sono stati utilizzati appropriati controlli positivi allo scopo di valutare la specificità della reazione.

L'immunopositività è stata valutata, in base alla citolocalizzazione, in prevalentemente *membranosa* (segnale esclusivamente di membrana o associato a una più lieve positività citoplasmatica) o aberrante *citoplasmatica* (segnale di membrana completamente assente). Nei casi con positività citoplasmatica, l'immunoreattività è stata inoltre graduata integrando i riscontri relativi all'intensità del segnale (1: lieve; 2: moderata; 3: elevata) e alla percentuale di cellule positive (1: < 10%; 2: 11–30%; 3: 31–60%; 4: > 60%) in un punteggio finale (*Kit immunoreactivity score, Kit IS*), come da studi precedenti [Sabattini e Bettini, 2010].

Analisi mutazionale

Il DNA è stato purificato da sezioni istologiche di 6-8 µm di tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina. Le sezioni sono state deparaffinate e colorate con EE per contrassegnare le aree più rappresentative (contenenti in proporzione un elevato numero di cellule neoplastiche) da sottoporre a campionamento. Il materiale così identificato è stato raccolto utilizzando tamponi di cotone imbevuti in PBS. La punta dei tamponi è stata trasferita in altrettante provette tipo *Eppendorf* da 1.5 ml e completamente immersa in 1 ml di *buffer* di lisi (*ChargeSwitch™, Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) con aggiunta di 10 µl di *proteasi* K. Le provette sono state poi poste in un agitatore (*MixMate™, Eppendorf*, Amburgo, Germania) a 500 rpm per un'ora. Successivamente il surnatante digerito è stato trasferito in nuove provette tipo *Eppendorf* sterili da 1.5 ml e il DNA genomico è stato purificato utilizzando un kit commerciale (*ChargeSwitch™ Forensic DNA Purification Kit, Invitrogen*) secondo le istruzioni d'uso. Per ciascun gruppo di campioni sottoposti a purificazione è stato previsto un controllo costituito da un tampone immerso in PBS (controllo di estrazione).

Gli esoni 8, 9 e 11 del *Kit* felino sono stati amplificati mediante *polymerase chain reaction* (PCR) utilizzando i *primer* descritti da Isotani *et al.* (2010). I prodotti della PCR sono stati purificati utilizzando il kit *GenElute™* (*Sigma-Aldrich*), sequenziati con *Big Dye Terminator v. 1.1™* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e nuovamente puri-

ficati mediante gel-filtrazione utilizzando colonnine *Centri-Sep*TM (*Applied Biosystems*). Le sequenze sono state analizzate tramite elettroforesi capillare con un sequenziatore automatico (*ABI Prism*TM 310, *Applied Biosystems*), previa denaturazione con formammide (*HiDi*TM, *Applied Biosystems*). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati dal software *SeqScape*TM v2.5, *Applied Biosystems*.

I tumori sono stati classificati come “mutati” qualora presentassero polimorfismi a base singola (SNP), duplicazioni o delezioni/inserzioni (*delins*) che modificassero la codifica aminoacidica a carico di uno o più tra gli esoni 8, 9 e 11 del gene *c-Kit* felino. L'eventuale effetto deleterio dei SNP è stato giudicato tramite appositi software predittivi (*PolyPhen-2*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Analisi statistica

Il rapporto tra IM e disregolazione di *Kit* (citocalizzazione aberrante, presenza di mutazioni, tipo di mutazione) è stato valutato mediante *Mann Whitney U test*. Il *test dei ranghi di Spearman* è stato utilizzato per indagare l'esistenza di una correlazione tra IM e *Kit IS*.

Il rapporto tra espressione immunoistochimica di *Kit* e mutazioni di *c-Kit* è stato valutato mediante *test esatto di Fisher* (citocalizzazione e presenza di mutazioni; citocalizzazione e tipo di mutazione) e *Mann Whitney U test* (*Kit IS* e presenza di mutazioni; *Kit IS* e tipo di mutazione).

Le differenze nei parametri valutati (IM, espressione immunoistochimica di *Kit* e mutazioni di *c-Kit*) a seconda della presentazione clinica (MCT solitari o disseminati), del decorso clinico (RC o MP), del numero di lesioni cutanee insorte durante il periodo di osservazione (MCT solitari o disseminati) e dell'esito clinico (in vita/deceduto per altre cause/perso al *follow-up* o deceduto a causa del MCT) sono state testate mediante *Mann Whitney U test* (IM, *Kit IS*) e *test esatto di Fisher* (citocalizzazione di *Kit*, presenza di mutazioni, tipo di mutazione).

È stata inoltre effettuata un'analisi univariata (*log-rank test*) di PFS e OS, valutando il significato prognostico dei seguenti parametri: diametro maggiore dei noduli (minore-uguale o maggiore del valore mediano); chirurgia (escissione completa o parziale), numero delle lesioni cutanee (MCT solitari o disseminati), IM (minore-uguale o maggiore del valore mediano), citocalizzazione di *Kit* (membranosa o citoplasmatica), *Kit IS* (minore-uguale o maggiore del valore mediano), presenza/assenza di mutazioni e tipo di mutazione. Nei casi in cui sono stati valutati diversi noduli concomitanti dello stesso gatto, nell'analisi univariata sono stati considerati l'IM più elevato e la presenza di espressione citoplasmatica e di mutazioni in almeno uno dei noduli. Nei casi in cui sono stati valutati diversi noduli non concomitanti, nell'analisi univariata è stato incluso soltanto il primo nodulo.

Il limite di significatività (*P*) è stato posto uguale o inferiore a 0.05. I test sono stati eseguiti con *SPSS Statistics*TM v. 19.0 (IBM, Somers, NY, USA) e *Prism*TM v. 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

5.3 Risultati

Segnalamento, presentazione clinica e decorso

Sono stati inclusi nello studio 22 gatti (**Tabella 5.2**), 20 europei, un meticcio a pelo lungo e un incrocio di siamese. C'erano 13 femmine (59%, di cui 11 sterilizzate) e 9 maschi (41%, tutti castrati). L'età era compresa tra 2 e 15 anni (media, 8.8 ± 3.71 anni).

Al momento della diagnosi, 13 gatti (59%) presentavano un unico nodulo cutaneo, 5 (23%) presentavano due noduli, un gatto (4%) presentava 6 noduli e 3 gatti (14%) presentavano da 10 a 20 noduli cutanei. In 15 gatti (68%) i noduli interessavano la regione cervico-facciale; il tronco era interessato in 8 casi (36%) e gli arti in 8 (36%), in 5 casi (23%) erano coinvolti gli arti anteriori e in 3 casi (14%) gli arti posteriori. Il diametro dei noduli era compreso tra 3 e 32 mm (media, 11.5 ± 7.42 mm) (**Figura 5.1**).

Dieci gatti (45%; 7 con un nodulo singolo, due con due noduli e uno con 6 noduli) sono stati sottoposti a stadiazione completa (esame fisico diretto, emocromo, pannello biochimico, esame del *buffy coat*, radiografie toraciche ed ecografia addominale), che in nessun caso ha mostrato la presenza di coinvolgimento viscerale. Un'eosinofilia ematica ($> 750/\text{mm}^3$) da lieve a moderata era presente in 4 gatti (40%; 3 con nodulo singolo, uno con due noduli). In nessuno dei 10 casi l'esame degli strisci da *buffy coat* ha evidenziato la presenza di mastociti circolanti. Nei restanti 12 casi (55%) non è stata effettuata una stadiazione adeguata.

Tutti i casi sono stati trattati chirurgicamente. L'exeresi era completa in 14 casi (64%) e parziale in 5 (23%), mentre in 3 casi (13%) i margini di escissione non sono stati valutati. In 9 casi (41%) è stata somministrata una terapia adiuvante a base di corticosteroidi per via orale. In un caso è stato somministrato l'inibitore tirosinchinasico *masitinib*.

I gatti sono stati seguiti per un periodo di tempo compreso tra 375 e 1922 giorni (media, 876 giorni; mediana, 640 giorni). La **Figura 5.2** illustra schematicamente il decorso dei casi durante il periodo di osservazione. Si sono verificate 10 remissioni complete (45%) e 12 progressioni di malattia (55%), tutte riguardanti l'insorgenza di nuovi noduli cutanei a distanza. Nei casi con malattia progressiva il PFS era compreso tra 11 e 555 giorni (media, 145 giorni; mediana, 71 giorni). Valutando l'intero periodo di osservazione, si sono avuti 12 MCT solitari (55%) e 10 MCT disseminati (45%). Due casi con MCT disseminato (ID 3 e 7) hanno sviluppato metastasi viscerali a livello di fegato e milza. In un caso (ID 6) l'insorgenza di metastasi viscerali era sospettata ma non è stata accertata. Al termine del periodo di osservazione (Dicembre 2011), 8 gatti (36%) erano deceduti a causa del MCT; in questi 8 casi il tempo di sopravvivenza era compreso tra 48 e 616 giorni (media, 283 giorni; mediana, 182 giorni). Undici gatti (50%) erano in vita al termine del periodo di osservazione, un gatto (5%; ID 9) è stato perso al *follow-up* dopo 778 giorni e due gatti (9%; ID 1 e 4) sono deceduti per cause estranee al MCT a 1796 e 1463 giorni, rispettivamente.

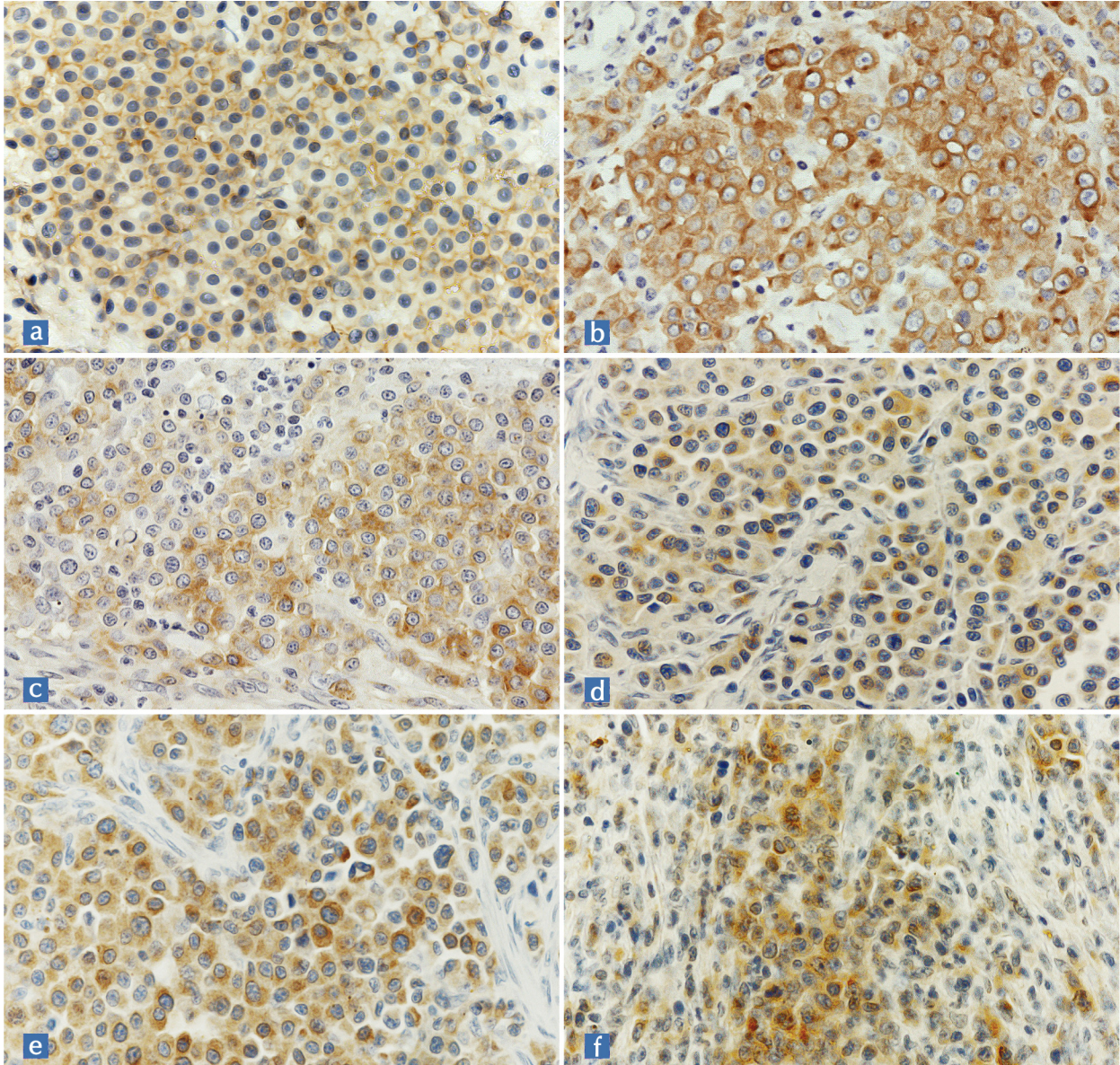


Figura 5.3 Espressione immunoistochimica di Kit in sezioni istologiche di mastocitoma cutaneo felino. (a) Espressione di membrana. (b) Intensa positività citoplasmatica estesa al 61-100% delle cellule neoplastiche della sezione (Kit IS = 3 x 4). (c) Positività di intensità variabile e nel complesso moderata che interessa il 31-60% delle cellule (Kit IS = 2 x 3). (d) Positività lieve estesa al 61-100% delle cellule (Kit IS = 1 x 4). (e) Positività di intensità moderata che interessa il 61-100% delle cellule (Kit IS = 2 x 4). (f) Positività intensa limitata al 31-60% delle cellule neoplastiche della sezione (Kit IS = 3 x 3). CD117, contrasto con Ematossilina di Papanicolau, 20x.

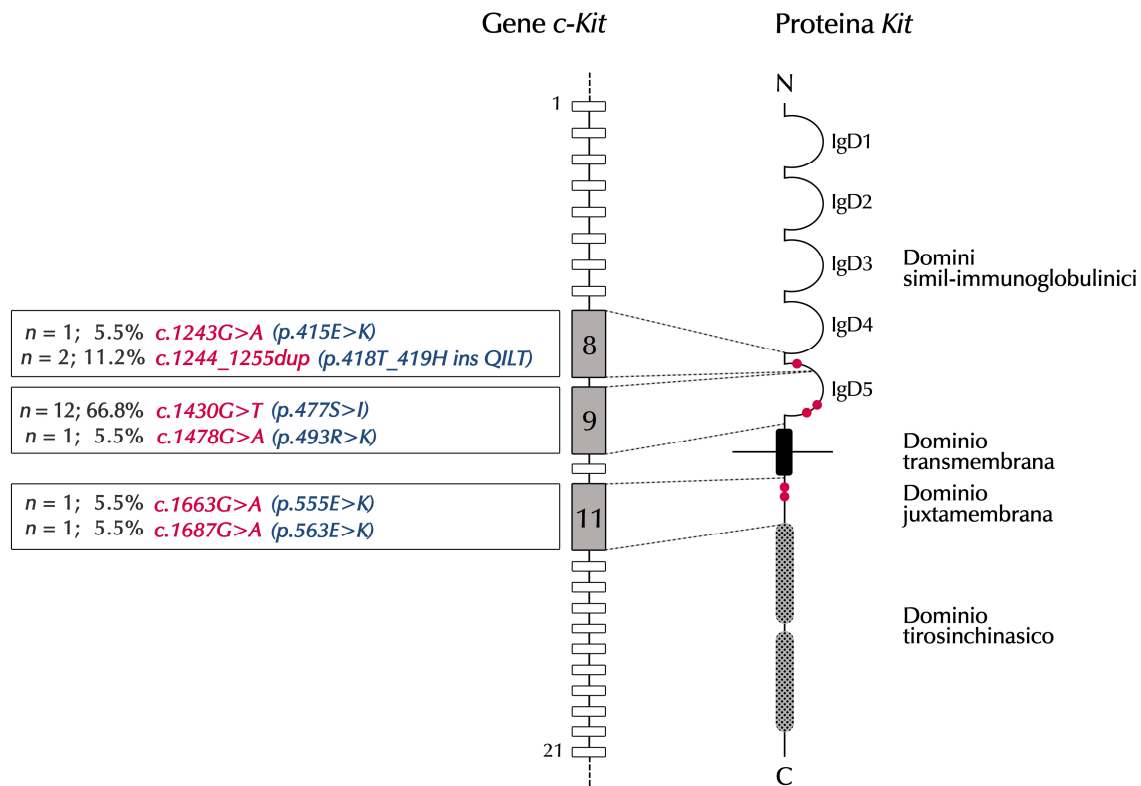


Figura 5.4 Rappresentazione schematica delle mutazioni di c-Kit a livello di esoni 8, 9 e 11 rilevate in 29 mastocitomi cutanei di gatto.

Distribuzione dei campioni e indice mitotico

Complessivamente, sono stati inclusi nello studio 31 noduli provenienti da 22 gatti. Per 14 gatti (63.6%) era disponibile un solo nodulo, per 5 gatti (22.7%; ID 2, 3, 4, 6, 10) erano disponibili due noduli concomitanti, per un gatto (4.6%; ID 21) erano disponibili 3 noduli concomitanti, mentre per due gatti (9.1%; ID 15 e 16) erano disponibili due noduli non concomitanti (asportati rispettivamente a 7 e a 10 mesi di distanza) (**Tabella 5.2**). La distribuzione dei 31 noduli è illustrata nella **Figura 5.2**.

L'indice mitotico variava da 0 a 37 mitosi per 10 CFI (media, 10.2; mediana, 5).

Espressione immunoistochimica di Kit

L'espressione di Kit è stata valutata sui 31 noduli e un grado variabile di positività è stato osservato in 30 casi. Il segnale era prevalentemente associato alla membrana in 7 noduli (23.3%) e prevalentemente citoplasmatico in 23 (76.7%). Nei casi con positività citoplasmatica, il Kit IS variava da 2 a 12 (media, 5.8 ± 2.59) (**Figura 5.3**).

Analisi mutazionale

La ricerca di mutazioni di *c-Kit* è stata effettuata su campioni di DNA provenienti dai 31 noduli inclusi nello studio. L'amplificazione degli esoni 8, 9 e 11 è stata possibile in soli 29 campioni, probabilmente a causa di uno stato di conservazione non adeguato nei restanti 2 casi. In totale, sono state osservate 18 mutazioni in 17 tumori (58.6%), di cui 3 (16.6%) a carico dell'esone 8, 13 (72.2%) a carico dell'esone 9 e 2 (11.2%) a carico dell'esone 11. Un caso presentava una doppia mutazione a livello di esone 9 e 11.

Le mutazioni riscontrate erano di 6 tipi diversi, di cui 5 polimorfismi a base singola e una duplicazione. Due erano a carico dell'esone 8 (*c.1243G>A* e *c.1244_1255dup*), due nell'esone 9 (*c.1430G>T* e *c.1478G>A*) e due nell'esone 11 (*c.1663G>A* e *c.1687G>A*) (**Figure 5.4** e **5.5**). La mutazione riscontrata più frequentemente è stata *c.1430G>T*, presente in 11 di 29 tumori (37.9%) ed è stata l'unico dei polimorfismi a base singola riscontrati ad essere giudicati di effetto deleterio.

Degli 8 casi in cui erano disponibili noduli multipli dello stesso animale, 5 (71.4%) presentavano mutazioni diverse, mentre due casi (uno con noduli concomitanti e uno con noduli non concomitanti) presentavano lo stesso tipo di mutazione (*c.1430G>T* in entrambi i casi). Nel restante caso non è stato possibile amplificare la sequenza di uno dei due noduli.

Analisi statistica

Non sono emerse relazioni statistiche tra IM ed espressione immunohistochimica di *Kit* o presenza di mutazioni (**Tabella 5.3**).

Dei casi con espressione membranosa di *Kit*, 4 non presentavano mutazioni e due presentavano mutazioni (*c.1430G>T*; frequenza relativa, 7.1%). Dei casi con espressione citoplasmatica, 8 non presentavano mutazioni e 14 presentavano mutazioni (frequenza relativa, 50%) (**Figura 5.6**). L'associazione tra presenza di mutazioni e citolocalizzazione della proteina non è tuttavia risultata statisticamente significativa.

Al momento della diagnosi, l'espressione di *Kit* era citoplasmatica in tutti gli 11 casi di MCT disseminato e in 12 di 20 (60%) MCT solitari ($P = 0.029$). Nessun altro dei parametri valutati è risultato in rapporto con il numero di lesioni alla presentazione clinica.

Per quanto riguarda invece il decorso clinico, l'IM nei MCT che sono risultati disseminati al termine del periodo di osservazione (media, 14.3; mediana, 11) era significativamente ($P = 0.022$) più elevato rispetto ai MCT solitari (media, 5.3; mediana, 3). Inoltre tutti i MCT disseminati erano caratterizzati da un'espressione citoplasmatica di *Kit*, contro il 50% (7 di 14) dei MCT solitari ($P = 0.002$). Entrambi i parametri erano significativamente più elevati anche nei casi in cui si è avuto il decesso dell'animale ($P = 0.001$ e $P = 0.024$, rispettivamente). La stessa tendenza, sebbene non significativa, si è osservata anche nei gatti andati incontro a malattia progressiva rispetto a quelli in remissione completa (**Tabella 5.4**).

Tabella 5.3 Indice mitotico ed espressione immunohistochimica di Kit in 29 mastocitomi cutanei di gatto raggruppati in base alla presenza di mutazioni.

	Indice mitotico			Citocalizzazione di Kit			Kit IS ^a				
	Range	Media	Mediana	P	Membranosa	Citoplasmatica	P	Range	Media	Mediana	P
MCT senza mutazioni (n = 12; 41.4%)	0 – 24	8	5	0.738	4	8	0.354	2 – 12	6.2	6	0.868
MCT con mutazioni (n = 17; 58.6%)	0 – 37	11.4	5		2	14		2 – 12	6.4	6	
c.1243G>A (n = 1; 5.5%)	37	-	-		0	1		9	-	-	
c.1244_1255dup (n = 2; 11.2%)	0	-	-		0	2		4	-	-	
c.1430G>T (n = 12; 66.8%)	0 – 35	10.8	5		2	9		3 – 12	6.9	6	
c.1478G>A (n = 1; 5.5%)	3	-	-		0	1		8	-	-	
c.1663G>A (n = 1; 5.5%)	25	-	-		0	1		2	-	-	
c.1687G>A (n = 1; 5.5%)	2	-	-		0	1		6	-	-	

^a Kit IS = Kit immunoreactivity score.

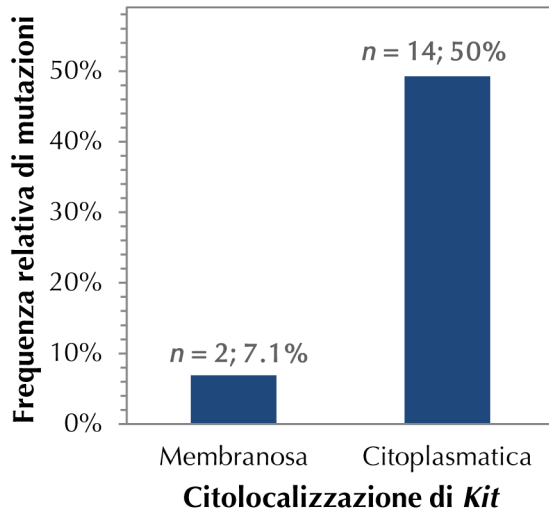


Figura 5.6 Associazione tra citocalizzazione della positività immunohistochimica per Kit e presenza di mutazioni di c-Kit.

All'analisi univariata, i parametri significativamente associati a un ridotto intervallo libero da progressione sono stati presenza di MCT disseminati alla diagnosi ($P = 0.003$), escissione chirurgica parziale ($P = 0.001$) e presenza di MCT disseminati al *follow-up* ($P < 0.001$), mentre quelli associati a ridotta sopravvivenza sono stati la presenza di MCT disseminati alla diagnosi ($P = 0.026$), la presenza di noduli con diametro > 1 cm ($P = 0.013$), la presenza di MCT disseminati ($P < 0.001$) e un indice mitotico > 5 per 10 CFI ($P = 0.001$).

Non sono state riscontrate relazioni statistiche tra Kit IS e presentazione clinica o decorso dei casi.

5.4 Discussione

Questo studio ha come obiettivo la valutazione dell'incidenza e della tipologia delle disregolazioni di *Kit* presenti nel mastocitoma felino sia a livello proteico che a livello genico, per una caratterizzazione del ruolo patogenetico e prognostico del recettore.

Il segnalamento dei gatti inclusi nello studio e la presentazione clinica alla diagnosi sono coerenti con i dati riportati in letteratura. Si conferma una prevalenza di gatti anziani senza particolare predisposizione di sesso; è tuttavia opportuno sottolineare che 5 di 22 soggetti (23%) presentavano meno di 6 anni al momento della diagnosi. Si conferma inoltre la predilezione della neoplasia per la regione cervico-facciale e in particolare per la pinna auricolare, interessata nel 27% dei casi [Macy e Reynolds, 1981; Buerger e Scott, 1987]. È invece abbastanza atipico il reperto di eosinofilia ematica in quattro soggetti con uno o due noduli e *staging* negativo: in studi precedenti la presenza di eosinofilia era infatti unicamente associata a MCT disseminati e intestinali [Bortonowski e Rosenthal, 1992; Gullledge e Boos, 1997; Antognoni *et al.*, 2003].

Allo scopo di definire il significato prognostico delle disregolazioni di *Kit*, i dati ottenuti sono stati messi in relazione al decorso clinico e ai due fattori prognostici considerati più attendibili nel mastocitoma felino: il numero delle lesioni e l'indice mitotico. Per evitare che il relativamente breve periodo minimo di *follow-up*, a fronte di un decorso clinico solitamente lento, potesse influenzare i risultati, all'analisi della sopravvivenza è

Tabella 5.4 Indice mitotico, espressione immunohistochimica di Kit e mutazioni di c-Kit in 31 mastocitomi di gatto raggruppati in base alla presentazione clinica e al decorso.

Parametri	Presentazione clinica			Follow-up						
	Totale	MCT solitari ^a	MCT disseminati ^a	RC ^b	MP ^b	MCT solitari ^c	MCT Disseminati ^c	In vita ^d	Deceduti ^d	P
N. campioni	31	20	11	11	20	14	17	18	13	
Indice mitotico										0.001
Range	0-37	0-24	0-37	0-24	0-37	0-24	0-37	3-12	5-37	
Media	10.2	7.5	15.2	5.7	12.7	5.3	14.3	6.5	18.4	
Mediana	5	4.5	10	2	8	3	11	6	17	
Citocalizzazione di Kit										0.024
Membranosa	7	7	0	5	2	7	0	7	0	
Citoplasmatica	23	12	11	6	17	7	16	11	12	
Kit IS^e										0.489
Range	2-12	3-12	2-9	4-8	2-12	3-8	2-12	3-8	2-12	
Media	5.8	5.9	6	5.8	6.2	5	6.4	5.5	6.3	
Mediana	6	6	6	5	6	4	6	6	6	
Mutazioni c-Kit^f										0.703
No	12	8	4	5	7	6	6	8	4	
Sì	17	10	7	6	11	7	10	9	8	
c.1243G>A	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
c.1244_1255dup	2	2	0	2	0	2	0	2	0	
c.1430G>T	12	7	5	3	9	4	8	6	6	
c.1478G>A	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
c.1663G>A	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
c.1687G>A	1	1	0	1	0	1	0	1	0	

^a Numero di lesioni cutanee alla presentazione clinica; MCT solitari = < 5 noduli concomitanti; MCT disseminati = ≥ 5 noduli concomitanti.

^b RC = remissione completa; MP = malattia progressiva.

^c Numero di lesioni cutanee insorte durante il periodo di osservazione; MCT solitari = < 5 noduli concomitanti; MCT disseminati = ≥ 5 noduli concomitanti.

^d In vita = in vita, perso al follow-up dopo il periodo minimo di osservazione o deceduto per altre cause dopo il periodo minimo di osservazione; deceduto = deceduto a causa del mastocitoma.

^e Kit IS = Kit immunoreactivity score.

^f E = esone.

Tabella 5.5 *Analisi univariata dei fattori potenzialmente associati all'intervallo libero da progressione e alla sopravvivenza in 22 gatti con mastocitoma cutaneo.*

Parametri	N. gatti	PFS ^a Media ± ES (giorni)	P	OS ^a Media ± ES (giorni)	P
N. lesioni cutanee alla presentazione^b			0.003		0.026
MCT <i>solitari</i>	17	1081 ± 211		1138 ± 191	
MCT <i>disseminati</i>	5	65 ± 20		385 ± 109	
Diametro maggiore			0.083		0.013
≤ 10	12	1236 ± 241		1677 ± 142	
> 10	10	444 ± 172		661 ± 174	
Chirurgia			0.001		0.169
Exeresi completa	14	1064 ± 229		1313 ± 210	
Exeresi parziale	5	48 ± 19		415 ± 133	
N. lesioni cutanee al follow-up^c			< 0.001		< 0.001
MCT <i>solitari</i>	12	1502 ± 205		NA	
MCT <i>disseminati</i>	10	121 ± 52			
Indice mitotico^d			0.103		0.001
≤ 5	12	1048 ± 245		1627 ± 156	
> 5	10	594 ± 255		645 ± 233	
Citolocalizzazione di Kit			0.146		0.078
<i>Membranosa</i>	5	1462 ± 324		NA	
<i>Citoplasmatica</i>	17	647 ± 197			
Kit IS^e			0.522		0.382
≤ 6	11	659 ± 214		972 ± 193	
> 6	6	442 ± 258		716 ± 291	
Mutazioni di c-Kif^f			0.77		0.821
No	8	774 ± 257		1147 ± 218	
Sì	13	895 ± 232		1192 ± 215	
c.1243G>A	1	22		183	
c.1244_1255dup	2	526		526	
c.1430G>T	9	707 ± 251		1102 ± 254	
c.1478G>A	1	1796		1796	
c.1663G>A	1	13		181	
c.1687G>A	1	1463		1463	

^aPFS = intervallo libero da progressione; OS = sopravvivenza; NA = non applicabile.

^bNumero di lesioni cutanee alla presentazione clinica; MCT solitario = < 5 noduli concomitanti; MCT disseminato = ≥ 5 noduli concomitanti.

^cNumero di lesioni cutanee insorte durante il periodo di osservazione; MCT solitario = < 5 noduli concomitanti; MCT disseminato = ≥ 5 noduli concomitanti.

^eSuddivisione effettuata utilizzando la mediana come valore di *cut-off*; Kit IS = *Kit immunoreactivity score*.

^dE= esone.

stata affiancata una valutazione del decorso clinico di tipo qualitativo (ricomparsa o meno della malattia, esito finale).

Sia il numero delle lesioni che l'IM si sono confermati fattori prognostici attendibili. In particolare, la stima del numero complessivo di lesioni cutanee insorte durante il periodo di osservazione si è rivelato il parametro statisticamente più rilevante, se si considera che il 100% dei decessi sono risultati associati alla presenza di MCT disseminati ($P < 0.001$).

Diversamente dai riscontri di Webster *et al.* (2007) nel MCT del cane, dove i tumori con espressione aberrante di *Kit* o mutazioni di *c-Kit* erano associati ad aumentata proliferazione cellulare, in questo studio i casi con disregolazioni di *Kit* non presentavano IM più elevato. Tuttavia, una localizzazione citoplasmatica aberrante del recettore è stata ritrovata più frequentemente nei MCT disseminati ($P = 0.024$) e nei casi ad esito sfavorevole ($P = 0.024$), con una tendenza alla riduzione dei tempi di sopravvivenza. Lo stesso trend era stato evidenziato anche in uno studio precedente condotto su 25 casi di MCT felino, ma non era risultato statisticamente significativo, questo potrebbe dipendere dal più ridotto numero di casi ad esito sfavorevole nell'altro studio [Sabattini e Bettini, 2010]. Al contrario, la quantificazione dell'espressione immunoistochimica di *Kit* (*Kit IS*), non è risultata rilevante ai fini prognostici. Questo è in accordo con quanto riportato nel cane, dove solo il *Kit pattern* e la presenza di mutazioni sono associati a un grado istologico più elevato e a una riduzione dei tempi di sopravvivenza [Webster *et al.*, 2006]. Tuttavia, nello studio precedente, i tumori di gatti deceduti a 24 mesi dalla diagnosi presentavano un *Kit IS* significativamente più elevato rispetto ai gatti ancora in vita [Sabattini e Bettini, 2010]. Questo può dipendere dal limite di voler applicare un sistema di *scoring* a una metodica prevalentemente qualitativa (o al massimo semiquantitativa) come l'immunoistochimica, che risente dell'influenza di numerose variabili, tra cui l'immunoreattività dei tessuti, legata alla conservazione dei campioni e ai tempi di fissazione. Fattori che, data la natura retrospettiva dello studio, sono da considerarsi estremamente incostanti. Queste variabili sono in grado di influenzare significativamente sia l'intensità della positività che la quantità di cellule positive, mentre la citolocalizzazione del segnale è mantenuta anche in condizioni non ottimali. Allo scopo di confermare o escludere la rilevanza prognostica del *Kit IS* sarà necessario ampliare il numero delle valutazioni e affiancare all'immunoistochimica una metodica che permetta una quantificazione più precisa dei livelli di positività, come l'immunofluorescenza o il *Western blot*.

Abbiamo inoltre valutato il tipo e la frequenza delle mutazioni di *c-Kit* nei nostri campioni. Le mutazioni sono state evidenziate in più della metà di casi (17 di 29; 58.6%). La maggior parte (89%) era localizzata a livello di esoni 8 e 9, regione corrispondente al quinto dominio simil-immunoglobulinico (IgD5) della proteina, mentre il dominio juxtamembrana, codificato dall'esone 11, era interessato con una prevalenza dell'11%. Nell'uomo mutazioni a livello di IgD5 sono state riscontrate, anche se con frequenza inferiore, nella leucemia mieloide acuta (26%) e nei tumori gastrointestinali stromali (18%) [Care *et al.*, 2003; Heinrich *et al.*, 2003]. Per quanto riguarda nello specifico le neopla-

sie mastocitarie, il *pattern* mutazionale osservato in questo studio si discosta da quello della mastocitosi sistemica dell'uomo, in cui la mutazione prevalente è *c.7176A>T* (p.816D>V), a livello di esone 17 [Garcia-Montero *et al.*, 2006] ed è invece più simile a quello osservato nella mastocitosi infantile, anche se in quest'ultima la frequenza è inferiore [Lanternier *et al.*, 2008]. Nel MCT del cane le mutazioni interessano nella maggior parte dei casi l'esone 11, tuttavia, in uno studio di Letard *et al.* (2008) condotto su 191 cani, è stato rilevato anche un significativo numero di mutazioni a livello di IgD5 (esone 8, 4.7%; esone 9, 4.2%). Nel MCT di gatto sono stati effettuati finora quattro studi finalizzati alla ricerca di mutazioni di *c-Kit*, di cui soltanto uno ha preso in considerazione un numero rilevante di casi e di sequenze nucleotidiche (Tabella 5.6). Anche in questi studi la frequenza delle mutazioni è estremamente elevata (67.7-100%) e il quinto IgD è interessato con una prevalenza compresa tra il 95% e il 100%, sebbene i singoli SNP evidenziati siano solo in parte gli stessi.

A carico dell'esone 8 sono state identificate due diverse mutazioni, localizzate a livello di residui 415-419. Mutazioni a questo stesso livello sono frequenti nella mastocitosi infantile e sono riportate nel 4% dei MCT di cane [Lanternier *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2008; Letard *et al.* 2008]. Una (*c.1244_1255dup*), rappresentata da un'inserzione di 4 aminoacidi (glutammina, isoleucina, leucina e treonina) tra i residui treonina 418 e istidina 419, è la mutazione più frequentemente riportata nel MCT felino (40.3-100%), mentre

Tabella 5.6 Studi riguardanti le mutazioni di *c-Kit* nel mastocitoma cutaneo felino.

	Casi	Sequenze amplificate	Mutazioni
Dank <i>et al.</i> , 2002	10 MCT splenici (da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina)	Esoni 11, 12, 17	0/10
Isotani <i>et al.</i> , 2006	Un gatto con mastocitosi sistemica e mastocitemia (da FNA)	Intera sequenza nucleotidica	1/1 <i>c.1244_1245dup</i> (esone 8)
Hadzijusufovic <i>et al.</i> , 2009	3 MCT splenici (da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina)	Esone 8	3/3 <i>c.1244_1245dup</i> (esone 8)
Isotani <i>et al.</i> , 2010	62 gatti con MCT splenico, cutaneo o generalizzato (da tessuto congelato o fissato in formalina e incluso in paraffina)	Esoni 8, 9, 11, 13, 17	42/62 (67.7%) 1/17 <i>c.957_966delinsT</i> (esone 6) 25/62 <i>c.1244_1255dup</i> (esone 8) 1/62 <i>c.1256_1264delinsTCA</i> (esone 8) 2/62 <i>c.1256_1262delinsT</i> (esone 8) 12/62 <i>c.1430G>T</i> (esone 9) 3/62 <i>c.1517_1518delinsTT</i> (esone 9) 1/62 <i>c.1661_1663delinsGCAGTGCACC</i> (esone 11)

nel nostro studio era presente in soli due casi (6.9%). Ipoteticamente questa mutazione potrebbe essere più frequente nel MCT splenico, dove è maggiormente descritta. La seconda mutazione (*c.1243G>A*) era rappresentata da un SNP con sostituzione di acido glutammico con lisina a livello di residuo 415. Mutazioni a questo livello possono alterare significativamente la dimerizzazione dei recettori dopo il legame con SCF e possono pertanto essere implicate nell'attivazione costitutiva del recettore. In questo studio entrambe le mutazioni erano in effetti associate ad espressione aberrante citoplasmatica, ma non sempre ad una prognosi infausta. In entrambi i casi con l'inserzione si è avuta infatti remissione completa, il caso con la sostituzione ha avuto esito sfavorevole, ma il gatto presentava anche altri noduli con una mutazione a livello di esone 9.

A carico dell'esone 9 erano presenti due diversi SNP, uno (*c.1430G>T*), riscontrato nel 41.4% dei casi, corrisponde alla seconda più frequente (19.4%) mutazione descritta da Isotani *et al.* (2010) e consiste nella sostituzione di una serina con un'isoleucina a livello del residuo 477. Nonostante la precisa funzione di questo residuo non sia nota, studi *in vitro* hanno dimostrato che la mutazione determina l'attivazione costitutiva del recettore [Isotani *et al.*, 2010]. La medesima mutazione è riportata anche nel cane come mutazione attivante [Letard *et al.*, 2008] ed è stata la sola ad essere considerata potenzialmente nociva dai software predittivi. Questa mutazione era associata a un'espressione aberrante di *Kit* in 9 di 11 casi (72.7%) e i tre-quarti dei gatti (8 di 12) con questa mutazione ha sviluppato MCT disseminato ad esito sfavorevole. Tuttavia non è stata evidenziata una relazione statisticamente significativa tra prognosi e presenza di questa mutazione. L'altra mutazione (*c.1478G>A*) non è mai stata segnalata precedentemente; era associata a localizzazione citoplasmatica ma non ad esito sfavorevole.

A livello di esone 11 sono stati evidenziati due SNP a livello di residui 555 e 563. Il primo (*c.1663G>A*) è allo stesso livello della mutazione riportata da Isotani *et al.* (2010) in un solo caso (*c.1661_1663 delinsGCAGTGCACC*) e coincide con la regione *hot spot* più frequentemente interessata da mutazioni nel MCT del cane [Letard *et al.*, 2008]; l'altra (*c.1687G>A*) è a ridosso dei siti di autofosforilazione, fondamentali per l'attività tirosinchinasica del recettore [Mol *et al.*, 2004]. In entrambi i noduli era presente un'espressione citoplasmatica della proteina e la prima mutazione era associata ad una prognosi sfavorevole.

Le mutazioni a carico dell'esone 11 nel cane sono associate a un grado istologico più elevato e a un'aumentata probabilità di recidiva ed esito sfavorevole. [Zemke *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2006]. Una relazione altrettanto chiara non è stata evidenziata in questo studio nel gatto, né per l'esone 11 né per le altre mutazioni osservate e all'analisi predittiva nessuno dei SNP è risultato nocivo a eccezione di *c.1430G>T*. Questi dati non sono comunque da considerarsi completamente attendibili, dal momento che i modelli predittivi giudicano la pericolosità di una mutazione basandosi su quanto essa è in grado di alterare la struttura e la stabilità della proteina e la fosforilazione non è probabilmente considerata da questo punto di vista un cambiamento essenziale.

Nel nostro studio, due (12.5%) dei tumori con mutazioni di *Kit* (entrambe

c.1430G>T) presentavano un'espressione di membrana, mentre il 66.7% dei casi che non presentavano mutazioni avevano comunque un'espressione citoplasmatica. La mancanza di una concordanza perfetta tra espressione citoplasmatica di *Kit* e presenza di mutazioni è comunque coerente con quanto osservato nel cane. In uno studio condotto da Webster *et al.* (2006) su 60 MCT di cane, due di 9 MCT con mutazioni presentavano positività di membrana e 28 presentavano una positività citoplasmatica nonostante l'assenza di mutazioni. Una possibile spiegazione per l'assenza di segnale citoplasmatico in MCT con mutazioni può essere il fatto che il tumore ha solo da poco acquisito la mutazione, e i cambiamenti nel *pattern* di espressione della proteina potrebbero non avere ancora avuto luogo al momento dell'intervento. Inoltre, altri fattori possono essere responsabili di una delocalizzazione dell'espressione della proteina, ad esempio mutazioni a carico delle sequenze nucleotidiche non amplificate o un'aumentata sintesi proteica per effetto di una iperstimolazione da parte del ligando [Longley *et al.*, 2001]. Questo potrebbe anche giustificare il fatto che la delocalizzazione del recettore fosse correlata alla ricomparsa della malattia e ad una prognosi sfavorevole, mentre non lo era la presenza di mutazioni. Il rapporto tra mutazioni ed espressione di *Kit* nel MCT felino necessita di essere definito su casistiche più ampie.

Un aspetto caratteristico del MCT felino è la frequente tendenza all'insorgenza di noduli multipli, concomitanti o a distanza di tempo. Il dubbio in questi casi è se interpretarli come secondarismi di un tumore primitivo oppure come eventi indipendenti. Nel MCT del cane diversi autori sono concordi nell'affermare che l'insorgenza di un nuovo nodulo a distanza non riduce significativamente i tempi di sopravvivenza e non deve essere interpretato come fattore prognostico negativo [Mullins *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2011; O'Connell e Thomson, 2011]. Nel nostro studio, sebbene i MCT disseminati fossero associati nella maggior parte dei casi a un elevato indice mitotico e a una prognosi sfavorevole, due casi classificati come MCT disseminati presentavano IM estremamente bassi e sopravvivenza a lungo termine. In entrambi i casi i noduli erano in numero inferiore a 10 e tutti di dimensioni inferiori a 1 cm. Nel cane lo stato mutazionale di mastocitomi multipli è stato indagato in soli due casi, in cui la presenza della stessa mutazione somatica in noduli insorti a distanza di tempo ha potuto dimostrare la comune origine clonale dei tumori, provando che si trattava della stessa malattia [Zavodovskaya *et al.*, 2004]. In questo studio, di 7 casi con noduli multipli, 5 presentavano uno *status* mutazionale diverso. Questo da un lato fornisce la conferma che si tratti di mutazioni somatiche e non presenti a livello germinale, ma dall'altro va contro l'ipotesi che i noduli multipli siano da interpretare come lesioni metastatiche di un tumore primitivo o, nel caso lo fossero, che la mutazione sia alla base dello sviluppo e della progressione della malattia. Inoltre, il fatto che potenzialmente in un gatto con MCT disseminato ogni nodulo possa presentare una mutazione diversa, costituisce un ostacolo sia alla possibilità di individuare un eventuale significato prognostico delle mutazioni di *c-Kit*, sia di valutare nello specifico la prognosi dell'animale e l'eventuale risposta alla terapia con inibitori tirosinchinasici.

5.5 Conclusioni

Questo studio conferma il significato prognostico negativo della presenza e dell'insorgenza di mastocitomi cutanei disseminati (5 o più noduli) e di un indice mitotico superiore a 5 mitosi in 10 campi a forte ingrandimento. Abbiamo inoltre riscontrato la presenza di un elevato numero di mutazioni a carico del proto-oncogene *c-Kit*, concentrate soprattutto a livello di esoni 8 e 9 (quinto dominio simil-immunoglobulinico). La frequenza osservata (55%) è superiore rispetto a quella riportata nel MCT del cane nella maggior parte degli studi ma, al contrario di quest'ultimo, non è emersa una relazione statistica tra presenza di mutazioni e prognosi, anche per il fatto che noduli multipli dello stesso gatto presentano spesso mutazioni diverse. Il confronto con il *pattern* immunohistochimico ha messo in evidenza una debole associazione tra espressione aberrante citoplasmatica e presenza di mutazioni, potenzialmente attribuibile al limitato numero di casi. Tuttavia, dal momento che una significativa proporzione di casi senza mutazioni presentava comunque espressione citoplasmatica della proteina, non si esclude che possano esistere altre cause per la delocalizzazione del recettore. L'espressione citoplasmatica di *Kit* emerge comunque come fattore prognostico negativo e si associa più frequentemente a una presentazione disseminata della malattia, mentre, al contrario dello studio precedente, non è emerso un significato prognostico del livello di positività immunohistochimica, potenzialmente a causa dei limiti insiti nella metodica utilizzata.

È necessario estendere queste valutazioni a un più ampio numero di casi per una migliore comprensione del ruolo di *Kit* nel mastocitoma felino e per la selezione di pazienti che potrebbero ottenere un beneficio dal trattamento con inibitori tirosinchinasi.

Bibliografia

- Allan R, Halsey TR, Thompson KG. Splenic mast cell tumor and mastocytæmia in a cat: case study and literature review. *New Zealand Veterinary Journal* 2000; **48**: 117-121.
- Antognoni MT, Spaterna A, Lepri E, Fruganti A, Laus F. Characteristic clinical, haematological and histopathological findings in feline mastocytoma. *Veterinary Research Communications* 2003; **1**: 727-730.
- Bortnowski HB, Rosenthal RC. Gastrointestinal mast cell tumors and eosinophilia in two cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1992; **28**: 271-275.
- Burger RG, Scott DW. Cutaneous mast cell neoplasia in cats: 14 cases (1975-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1987; **190**: 1440-1444.
- Brown CA, Chalmers SA. Diffuse cutaneous mastocytosis in a cat. *Veterinary Pathology* 1990; **27**: 366-369.
- Care, R.S., Valk, P.J., Goodeve, A.C., *et al.* Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *British Journal of Haematology* 2003; **121**: 775-777.
- Crafts GA, Pulley LT. Generalized cutaneous mast cell tumor in a cat. *Feline Practice* 1975; **5**: 57-58.
- Dank G, Chien MB, London CA. Activating mutations in the catalytic or juxta-membrane domain of c-kit in splenic mast cell tumors of cats. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 1129-1133.
- Garcia-Montero, A.C., Jara-Acevedo, M., Teodosio, C., *et al.* KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; **108**: 2366-2372.
- Garner FM, Lingeman CH. Mast-cell neoplasms of the domestic cat. *Pathologia Veterinaria* 1970; **7**: 517-530.
- Guerre R, Millet P, Groulade P. Systemic mastocytosis in a cat: remission after splenectomy. *The Journal of Small Animal Practice* 1979; **20**: 769-772.
- Gulledge L, Boos D. Cutaneous and visceral mast cell tumors in a cat. *Feline Practice* 1997; **25**: 13-15.
- Hadzijušufovic E, Peter B, Rebuzzi L, *et al.* Growth-inhibitory effects of four tyrosine kinase inhibitors on neoplastic feline mast cells exhibiting a KIT exon 8 ITD mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; **132**: 243-250.
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, *et al.* Kinase mutations and imatinib re-

- response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Clinical Oncology* 2003; **21**: 4342–4349.
- Hoffmann KM, Moser A, Lohse P, Winkler A, *et al.* Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood* 2008, **112**: 1655–1657.
- Holzinger EA. Feline cutaneous mastocytomas. *Cornell Vet* 1973; **63**: 87-93.
- Isotani M, Tamura K, Yagihara H, *et al.* Identification of a c-kit exon 8 internal tandem duplication in a feline mast cell tumor case and its favorable response to the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; **114**: 168-172.
- Isotani M, Yamada O, Lachowicz JL, *et al.* Mutations in the fifth immunoglobulin-like domain of KIT are common and potentially sensitive to imatinib mesylate in feline mast cell tumours. *British Journal of Haematology* 2010; **148**: 144-153.
- Johnson TO, Schulman FY, Lipscomb TP, Yantis LD. Histopathology and biologic behavior of pleomorphic cutaneous mast cell tumors in fifteen cats. *Veterinary Pathology* 2002; **39**: 452-457.
- Lamm CG, Stern AW, Smith AJ, Cooper EJ, Ullom SW, Campbell GA. Disseminated cutaneous mast cell tumors with epitheliotropism and systemic mastocytosis in a domestic cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2009; **21**: 710-715.
- Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS ONE* 2008, **3**, e1906.
- Lepri E, Ricci G, Leonardi L, Sforza M, Mechelli L. Diagnostic and prognostic features of feline cutaneous mast cell tumours: a retrospective analysis of 40 cases. *Veterinary Research Communication* 2003; **27**: 707-709.
- Letard S, Yang Y, Hanssens K, *et al.* Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research* 2008; **6**: 1137–1145.
- Litster AL, Sorenmo KU. Characterisation of the signalment, clinical and survival characteristics of 41 cats with mast cell neoplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2006; **8**: 177-183.
- Longley, B.J., Reguera, M.J. & Ma, Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia Research* 2001; **25**, 571–576.
- Macy DW, Reynolds HA: The incidence, characteristics and clinical management of skin tumors in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1981; **17**: 1026-1034.
- Miller MA, Nelson SL, Turk JR, *et al.* Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Veterinary Pathology* 1991; **28**: 389-395.
- Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K, Tyler JW, Buss MS. Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *Journal of American Animal Hospital Association* 1998; **34**: 281-284.

- Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2006; **228**: 91-95.
- Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, *et al.* Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: 31655-31663.
- Nielsen SW. Spontaneous hematopoietic neoplasms of the domestic cat. *National Cancer Institute Monograph* 1969.
- O'Connell K, Thomson M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* 2011; doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00301.x.
- Ogilvie GK, Moore AS: *Feline Oncology*. Veterinary Learning System, Trenton, NJ, USA, 2001.
- Rodriguez-Cariño C, Fondevila D, Segales J, Rabanal R: Expression of KIT receptor in feline cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 878-883.
- Sabattini S, Bettini G. Prognostic value of histologic and immunohistochemical features in feline cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2010; **47**: 643-653.
- Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, *et al.* Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology* 2011; **48**: 169-181.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The Role of c-KIT in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia* 2006; **8**: 104-111.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 2007; **44**: 298-308.
- Wilcock BP, Yager JA, Zink MC. The morphology and behavior of feline cutaneous mastocytomas. *Veterinary Pathology* 1986; **23**: 320-324.
- Zavodovskaya R, Chien MB, London CA. Use of kit internal tandem duplications to establish mast cell tumor clonality in 2 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2004; **18**: 915-917.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology* 2002; **39**: 529-535.

Pubblicazioni scientifiche derivate da questo studio:

“Kit receptor dyregulations in feline mast cell tumours and systemic mastocytosis”.

Sabattini S, Guadagni Frizzon M, Turba ME, Gentilini F, Capitani O, Bettini G. *Proceedings of the 2011 Annual Congress of the European Society of Veterinary Pathology* (ESVP); p 31; 8-10 September 2011, Uppsala, Sweden.

“KIT receptor tyrosine kinase dysregulation in feline cutaneous mast cell tumour”. **Sa-**

battini S, Guadagni Frizzon M, Turba ME, Gentilini F, Bettini G. *Proceedings of the 2012 Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology* (ESVONC); p 77; 1-3 March 2012, Paris, France.

Ruolo prognostico dell'espressione di EGFR nel carcinoma squamocellulare del gatto

6.1 Introduzione

Il carcinoma squamocellulare (SCC) è la più frequente neoplasia maligna della cute maligna del gatto e rappresenta il 15-50% di tutti i tumori cutanei felini, a seconda della latitudine geografica [Miller *et al.*, 1991; Ogilvie e Moore, 2001]. Può insorgere come neof ormazione solitaria o multipla, a carattere proliferativo o ulcerativo, e si osserva più frequentemente a livello di *planum* nasale, pinne auricolari e palpebre. I gatti a mantello bianco e cute non pigmentata hanno un rischio stimato da 5 a 13 volte superiore di sviluppare la malattia [Ogilvie e Moore, 2001]. L'insorgenza del SCC è stata associata all'esposizione cronica ai raggi del sole, ed è in genere preceduta da lesioni displastiche dell'epidermide (cheratosi attinica/carcinomi *in situ*). Mutazioni a carico del gene oncosoppressore p53 indotte dalle radiazioni ultraviolette sembrano avere un ruolo nella patogenesi della cheratosi attinica e sono state identificate in media nel 53% dei SCC cutanei felini [Ogilvie e Moore, 2001; Goldschmidt e Shofer, 1992; Favrot *et al.*, 2009].

Il SCC è un tumore caratterizzato da spiccata invasività locale, che porta alla progressiva erosione dei tessuti adiacenti (**Figura 6.1**), mentre le metastasi tendono a insorgere solo nelle fasi più avanzate [Ogilvie e Moore, 2001; Goldschmidt e Shofer, 1992]. Per il SCC cutaneo del gatto sono state proposte diverse modalità di trattamento, tra cui chirurgia, terapia fotodinamica e radioterapia, la cui efficacia è fortemente condizionata dallo stadio clinico e dall'estensione locale della malattia. Ulteriori limitazioni sono rappresentate dall'intenzione del proprietario di accettare le menomazioni deturpanti di una chirurgia radicale e dalla disponibilità di apparecchiature



Figura 6.1 Carcinoma squamocellulare auricolare in un gatto con mantello bianco (a sinistra) e carcinoma squamocellulare del planum nasale (a destra) (Gentile concessione della dott.ssa L. Marconato).

dedicate [Ogilvie e Moore, 2001].

I recettori tirosinchinasici (RTK) sono strutture molecolari attualmente oggetto di grande interesse nella ricerca oncologica. Si tratta di proteine di membrana la cui interazione con il ligando (generalmente un fattore di crescita) determina la trasduzione al nucleo di segnali collegati ad attività cellulari fondamentali, quali differenziazione, proliferazione e apoptosi [Ongkeko *et al.*, 2005]. I RTK giocano un ruolo centrale nello sviluppo e nella progressione di molte neoplasie: sovraespressione o mutazioni geniche possono indurre la sovraespressione dei RTK e l'attivazione costitutiva indipendente dall'interazione con il ligando specifico, con implicazioni che possono comprendere differenziazione, replicazione, aumento della motilità cellulare e inibizione dell'apoptosi [Ongkeko *et al.*, 2005; Holden *et al.*, 2008] (**Figura 6.2**). Nel carcinoma squamocellulare cervicofacciale dell'uomo (HNSCC), in gran parte assimilabile al SCC del gatto per sedi di insorgenza, fattori predisponenti e comportamento biologico, è stata individuata l'acquisizione di una via di regolazione autocrina che coinvolge il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) [Nelson e Grandis, 2007]. Nel 80-90% dei HNSCC sono stati rilevati elevati livelli di EGFR, significativamente correlati a una riduzione dei tempi di sopravvivenza [Harari, 2004]. Inoltre nell'uomo la sovraespressione di EGFR è stata osservata anche nelle lesioni displastiche che preludono allo sviluppo delle forme tumorali invasive [Harari, 2004]. Diversi studi hanno dimostrato l'effetto antitumorale diretto di agenti inibitori EGFR-specifici, impiegati da soli o in combinazione ai trattamenti convenzionali, anche se un metodo predittivo efficace per la selezione dei candidati a tali terapie non è ancora stato ottimizzato.

Ad oggi, nel SCC del gatto l'espressione di EGFR è stata caratterizzata in un solo studio e limitatamente alla forma orale (9 tumori positivi su 13 testati) [Looper

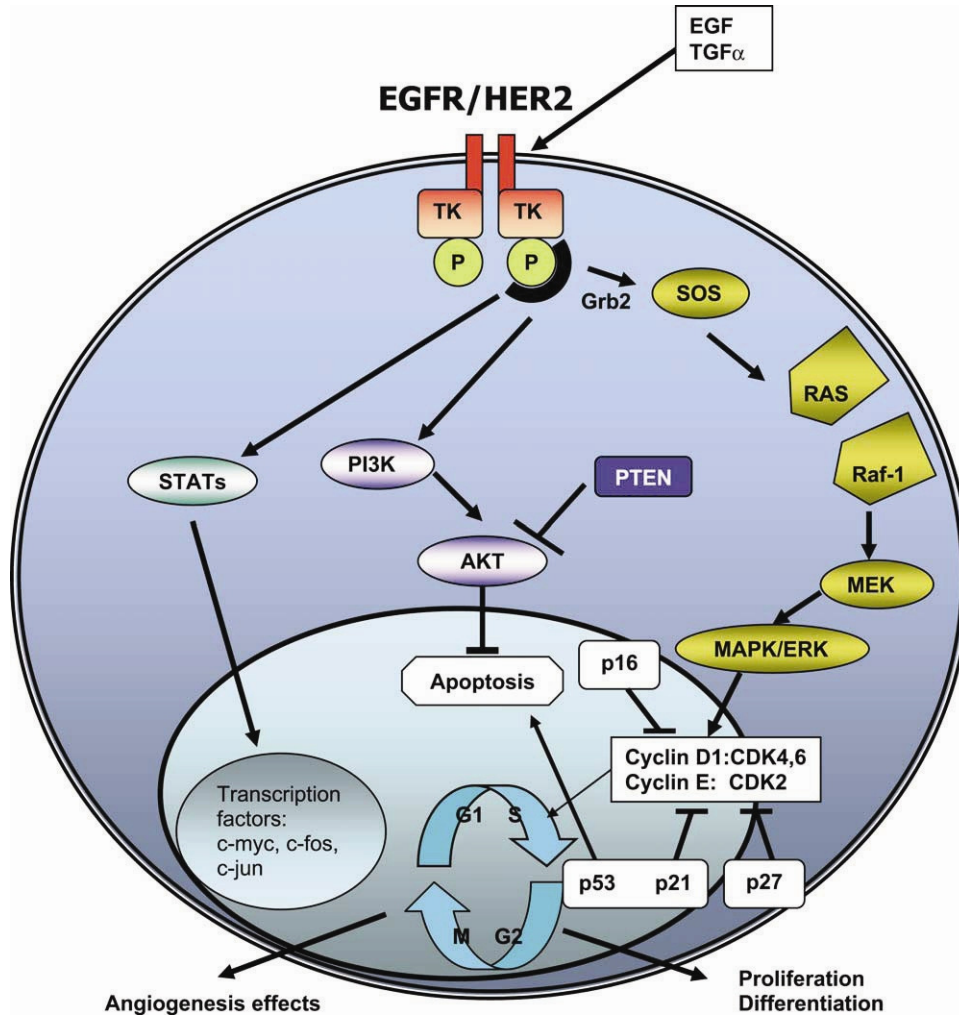


Figura 6.2 Schema che illustra la via del segnale EGFR-dipendente (da Hirsch et al., 2003).

et al., 2006]. Sebbene preliminari, i risultati suggeriscono la presenza di alterazioni nella via di trasduzione del segnale EGFR-dipendente in una sottopopolazione di gatti affetti da SCC, rendendoli potenziali candidati per terapie a bersaglio molecolare anti-EGFR.

In questo studio sono stati caratterizzati i livelli di espressione immunohistochemica di EGFR nel SCC cutaneo del gatto allo scopo valutarne l'utilità prognostica e il rapporto con altri parametri istopatologici.

6.2 Materiali e Metodi

Criteri di selezione e informazioni cliniche

Campioni chirurgici di SCC cutaneo felino pervenuti al servizio diagnostico di Anatomia Patologica (Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna) dal 2000 al 2007 sono stati inclusi retrospettivamente nello studio. I preparati erano stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 4 µm di spessore e colorati con ematosilina-eosina (EE). Nei casi di SCC a localizzazione multipla per i quali erano disponibili più campioni è stata valutata la lesione riportata come primitiva o quella di dimensioni maggiori. Sono stati inclusi definitivamente nello studio solo i casi corredati da sufficienti informazioni anatomo-cliniche (segnalamento, localizzazione, dimensioni del tumore). Ulteriori informazioni riguardanti colore del mantello, ambiente di vita prevalente (domestico/all'aperto), numero di lesioni, trattamento ricevuto, sviluppo di recidiva e/o metastasi e data dell'eventuale decesso sono state richieste ai proprietari o ai veterinari referenti mediante interviste telefoniche. Il periodo minimo di *follow-up* richiesto per l'inclusione è stato di 24 mesi dalla diagnosi.

Esame istologico

Per ciascun tumore è stata effettuata una valutazione del grado di differenziazione e dell'attività mitotica senza essere a conoscenza dei dati relativi alla sopravvivenza. Il grado di differenziazione è stato quantificato con un punteggio da 1 a 3 sulla base del livello di cheratinizzazione come segue: (1) SCC ben differenziati (abbondante citoplasma eosinofilo, ponti intercellulari ben evidenti, presenza di numerose perle cornee); (2) SCC moderatamente differenziati (cheratinizzazione di singole cellule o piccoli gruppi di cellule e rare perle cornee, ponti intercellulari poco visibili); (3) SCC scarsamente differenziati (cheratinizzazione limitata a singole cellule, citoplasma anfofilo e assenza di ponti intercellulari). L'attività mitotica è stata valutata contando il numero totale di figure mitotiche presenti in 10 campi a forte ingrandimento (400x).

Espressione di EGFR

La determinazione immunoistochimica (IIC) di EGFR è stata effettuata mediante tecnica streptavidina-biotina-perossidasi. Il blocco delle perossidasi endogene è stato ottenuto tramite incubazione in una soluzione di perossido di idrogeno al 3% in acqua distillata per 30 minuti mentre la riesposizione antigenica è avvenuta mediante digestione enzimatica: dopo un passaggio in TRIS a 37 °C per 5 minuti, le sezioni sono state incubate in una soluzione di proteasi XIV (P5147-1G, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) allo 0.05% (pH 7.5) per 15 minuti a 37°C. Il blocco della reazione è stato ottenuto mediante un successivo passaggio di 5 minuti in TRIS freddo. I campioni sono stati incubati con un anticorpo monoclonale di topo anti-EGFR diluito 1:100 in PBS (EGFR Ab-10, clone 111.6, *NeoMarkers*TM, Fremont, CA, USA) per un'ora in camera umida a 37°C. Quindi, previo

lavaggio in PBS e in acqua corrente, le sezioni sono state incubate con un kit di rivelazione a elevata sensibilità (*Dako REAL EnVision™ Detection System*), secondo le istruzioni del produttore. Infine le sezioni sono state risciacquate in PBS e in acqua corrente, colorate con *ematossilina di Papanicolau*, disidratate e montate.

Campioni di cute normale di 6 gatti deceduti in seguito a malattie di natura non neoplastica sono stati utilizzati come controlli positivi per la verifica dell'avvenuta reazione.

L'immunopositività per EGFR è stata valutata come da studi precedenti integrando i riscontri relativi all'intensità della positività (1: bassa; 2: moderata; 3: elevata) e alla percentuale di cellule positive (1: <10%; 2: 11-30%; 3: 31-60%; 4: >60%) in un punteggio finale (*EGFR-score*) [Looper *et al.*, 2006; Shiomitsu *et al.*, 2009]. Sono stati considerati positivi i tumori con *EGFR-score* > 2. È stata inoltre valutata la localizzazione della positività (membranosa o citoplasmatica).

Analisi statistica

I risultati delle osservazioni istologiche e immunoistochimiche sono stati correlati tra loro e con i dati relativi a segnalamento, anamnesi, sede anatomica, dimensione delle lesioni e *follow-up* mediante test statistici adeguati (*test esatto di Fisher*, *test dei ranghi di Spearman*, *test di Kruskal-Wallis* per l'analisi della varianza di variabili non parametriche).

L'intervallo libero da malattia e i tempi di sopravvivenza sono stati valutati mediante *curve di Kaplan-Meier*. Tramite analisi univariata della sopravvivenza (*log-rank test*) sono state comparate le curve relative a (1) tumori EGFR-positivi e negativi, (2) tumori ben differenziati e mediamente/scarsamente differenziati e (3) tumori a bassa e alta attività mitotica, utilizzando la mediana come valore *cut-off*. L'intervallo libero da malattia è stato calcolato come tempo (mesi) trascorso dalla data della diagnosi del tumore primitivo alla data della diagnosi di recidiva/metastasi o al termine del periodo di *follow-up* (24 mesi). La sopravvivenza è stata calcolata come tempo (mesi) trascorso dalla data della diagnosi alla data del decesso dell'animale o al termine del periodo di *follow-up*. I pazienti deceduti per cause estranee al SCC o vivi al termine del periodo di *follow-up* sono stati censurati.

Il limite di significatività (*P*) è stato posto uguale o inferiore a 0.05. I test sono stati eseguiti con *SPSS Statistics™* v. 17.0 (IBM, Somers, NY, USA) e *Prism™* v. 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

ID	Razza	Sesso ^a	Età (anni)	Mantello bianco	Vita all'aperto	Localizzazione e dimensioni del tumore	Neof. multiple	Espress. di EGFR	Intervallo libero da malattia	Esito (sopravvivenza)
1	Europeo	Fs	5	no	no	<i>planum</i> nasale, 10 mm	no	negativo	24 mesi	in vita (24 mesi)
2	Europeo	Mc	14	sì	sì	r. temporale, 10 mm	no	moderata	2 mesi	soppresso (23 mesi)
3	Europeo	Fs	13	sì	sì	palpebra, 5 mm	sì	bassa	malattia progressiva	soppresso (5 mesi)
4	Europeo	Mc	17	no	sì	pinna auricolare, 30 mm	sì	bassa	8 mesi	soppresso (12 mesi)
5	Europeo	Fs	15	sì	sì	pinna auricolare, 20 mm	sì	bassa	malattia progressiva	soppresso (12 mesi)
6	Europeo	Fs	11	no	no	pinna auricolare, 10 mm	sì	bassa	malattia progressiva	in vita (24 mesi)
7	Europeo	Mc	6	sì	sì	pinna auricolare, 5 mm	sì	moderata	24 mesi	in vita (24 mesi)
8	Europeo	Mc	8	sì	sì	<i>planum</i> nasale, 20 mm	sì	bassa	6 mesi	soppresso (7 mesi)
9	Europeo	Fs	10	no	no	pinna auricolare, 5 mm	no	bassa	malattia progressiva	in vita (24 mesi)
10	Europeo	Fs	4	no	no	pinna auricolare, 20 mm	no	bassa	3 mesi	soppresso (6 mesi)
11	Europeo	Fs	3	sì	sì	pinna auricolare, 20 mm	sì	negativo	malattia progressiva	in vita (24 mesi)
12	Europeo	Mc	10	sì	sì	pinna auricolare, 5 mm	sì	negativo	24 mesi	in vita (24 mesi)
13	Europeo	Mc	6	no	sì	r. sopracorbitale, 20 mm	no	elevata	3 mesi	soppresso (10 mesi)
14	Europeo	Mc	10	no	sì	collo, 30 mm	no	elevata	malattia progressiva	soppresso (1 mese)
15	Europeo	Fs	14	sì	no	pinna auricolare, 5 mm	no	moderata	4 mesi	altro (15 mesi)
16	Europeo	Mc	16	no	sì	<i>planum</i> nasale, 10 mm	no	negativo	24 mesi	altro (8 mesi)
17	Europeo	Mc	15	no	sì	labbro, 10 mm	no	elevata	12 mesi	in vita (24 mesi)
18	Europeo	Fs	1	no	no	labbro, 5 mm	no	negativo	24 mesi	in vita (24 mesi)
19	Europeo	Fs	3	sì	sì	pinna auricolare, 15 mm	no	elevata	4 mesi	soppresso (5 mesi)

^a M = maschio; F = femmina; Mc = maschio castrato; Fs = femmina sterilizzata.

Tabella 6.1
Segnalamento, anamnesi
e decorso clinico di 19
gatti con carcinoma
squamocellulare cutaneo.

6.3 Risultati

Segnalamento e presentazione clinica

Complessivamente sono stati inclusi nello studio 19 gatti Europei; 9 maschi castrati e 10 femmine sterilizzate. L'età media al momento della diagnosi era 9.5 anni (*range*, 1-17). Nove gatti erano a mantello bianco (47%) e 13 vivevano prevalentemente o esclusivamente all'aperto (68%); entrambi i fattori di rischio erano presenti in 8 casi (42%) (**Tabella 6.1**).

Dieci SCC erano localizzati a livello di pinna auricolare, 3 sul *planum* nasale, due a livello di labbro e un caso ciascuno a livello di palpebra, collo, regione sopraorbitale e regione temporale. Il diametro medio delle lesioni era 1.4 cm (*range*, 0.5-3 cm). In 8 casi (42%) è stata riportata la presenza di ulteriori noduli (1-2) di dimensioni minori localizzati sempre a livello di regione cervico-facciale (**Tabella 6.1**).

Esame istologico

Nove SCC sono stati classificati come ben differenziati (47%), 7 come mediamente differenziati (37%) e 3 come scarsamente differenziati (16%) (**Figure 6.3-6.5**). Il numero medio di mitosi era 28 per 10 campi a 400x (mediana, 24; *range*, 8-63). Non erano presenti relazioni statistiche tra il grado di differenziazione e il numero di mitosi (**Tabella 6.2**).

Espressione di EGFR

L'esame immunohistochimico ha rivelato un segnale positivo per EGFR in 14 tumori su 19

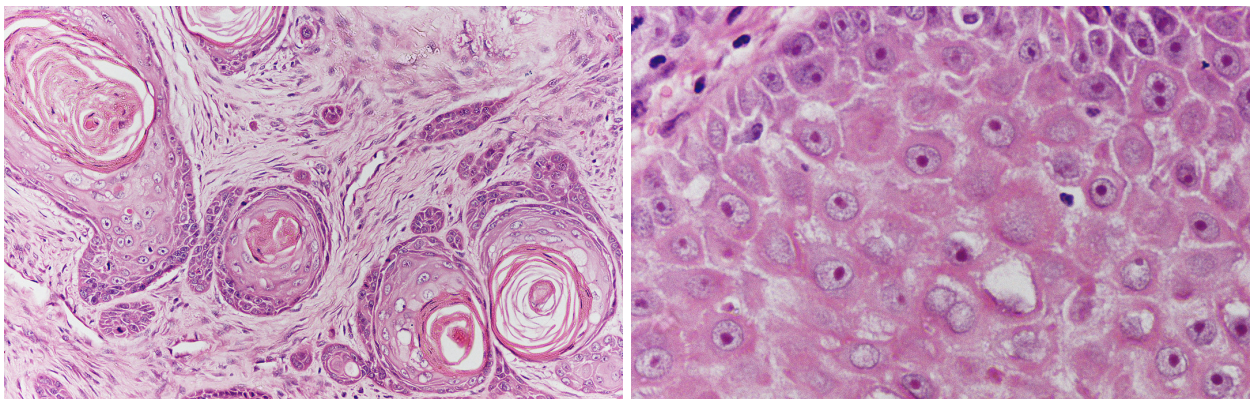


Figura 6.2 Gatto. Cute. Carcinoma squamocellulare ben differenziato. Caratteristica presenza di numerosi accumuli di varie dimensioni di cheratina lamellare (c.d. "perle cornee"). Nelle strutture epiteliali che compongono il tessuto neoplastico è riconoscibile una progressione ordinata da piccole cellule basali non cheratinizzate, situate alla periferia, a cellule cheratinizzate, voluminose e poligonali, che circondano le perle cornee centrali. A più forte ingrandimento (a destra), le cellule cheratinizzate presentano profili angolari, con citoplasma abbondante e intensamente eosinofilo, nuclei voluminosi e nucleoli prominenti, in genere singoli. I ponti intercellulari sono in gran parte mantenuti. Ematossilina-eosina, 4x (a sinistra) e 40x (a destra).

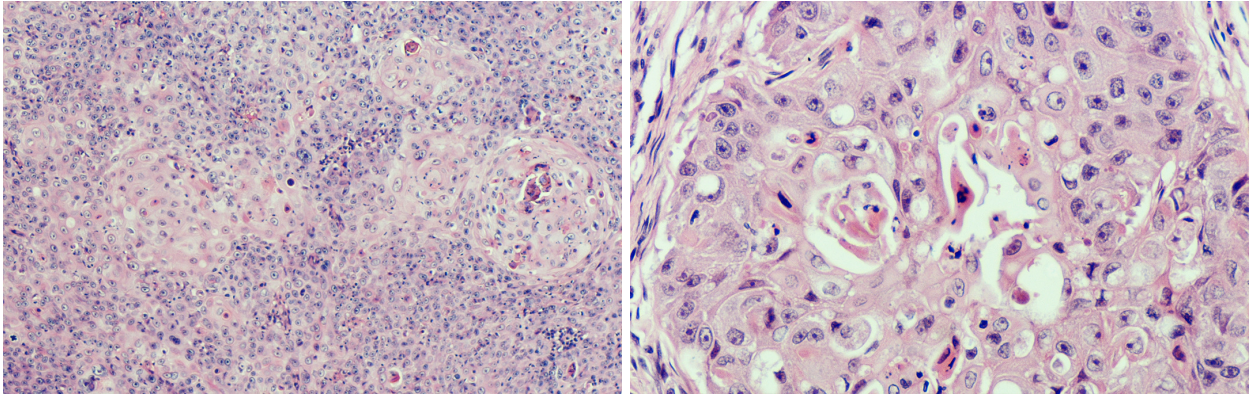


Figura 6.4 Gatto. Cute. Carcinoma squamocellulare mediamente differenziato. Assenza di polarizzazione delle strutture epiteliali e frequente cheratinizzazione di gruppi di cellule in assenza di vere e proprie perle cornee. A forte ingrandimento si osserva un grado moderato di anisocitosi e anisocariosi, con perdita dei ponti intercellulari. Ematossilina-eosina, 10x (a sinistra) e 40x (a destra).

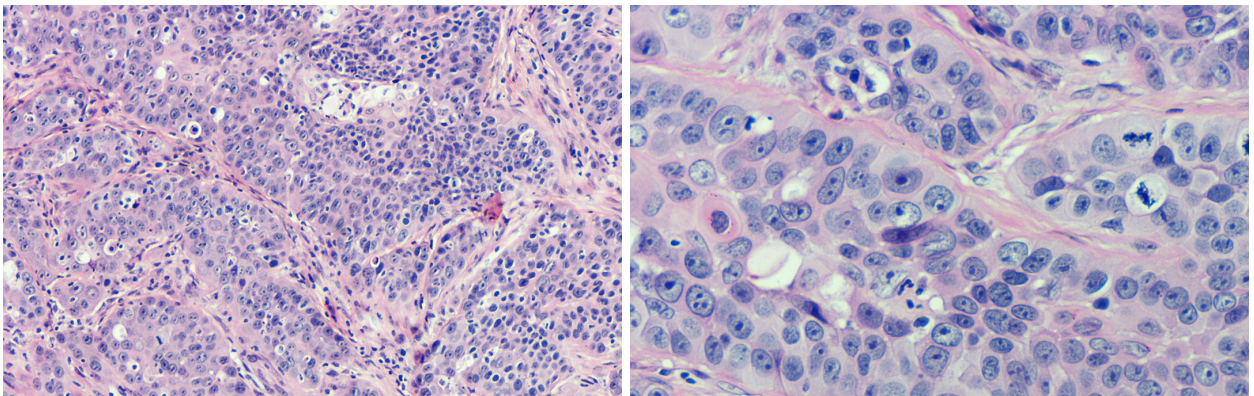


Figura 6.5 Gatto. Cute. Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato. Tessuto solido, a elevata cellularità, composto da isole e trabecole di cellule epiteliali separate da setti fibrovascolari. Non si riconoscono le tipiche strutture ad organizzazione concentrica. La cheratinizzazione è occasionale e limitata a cellule isolate. A più forte ingrandimento, i limiti cellulari sono poco definiti, con totale scomparsa dei ponti; le cellule neoplastiche presentano scarso citoplasma e anfofilo e nuclei vescicolosi, con nucleoli ben evidenti e spesso multipli. Sono presenti numerose figure mitotiche. Ematossilina-eosina, 10x (a sinistra) e 40x (a destra).

(74%). La **Figura 6.6** mostra esempi rappresentativi dell'immunopositività riscontrata. In tutti i tumori positivi (EGFR-score >2) il segnale era a livello di membrana, associato a una debole positività citoplasmatica in 5 casi (26%). L'intensità era maggiore nelle cellule situate alla periferia delle strutture trabecolari e tendeva a diminuire procedendo verso le cellule cheratinizzate centrali. L'EGFR-score medio nei casi positivi era pari a 6, il valore mediano 5; 7 SCC (37%) mostravano bassi livelli di espressione (EGFR-score, 3-5), 3 (16%) si attestavano su un livello intermedio (EGFR-score, 6-8), mentre in 4 casi (21%) il

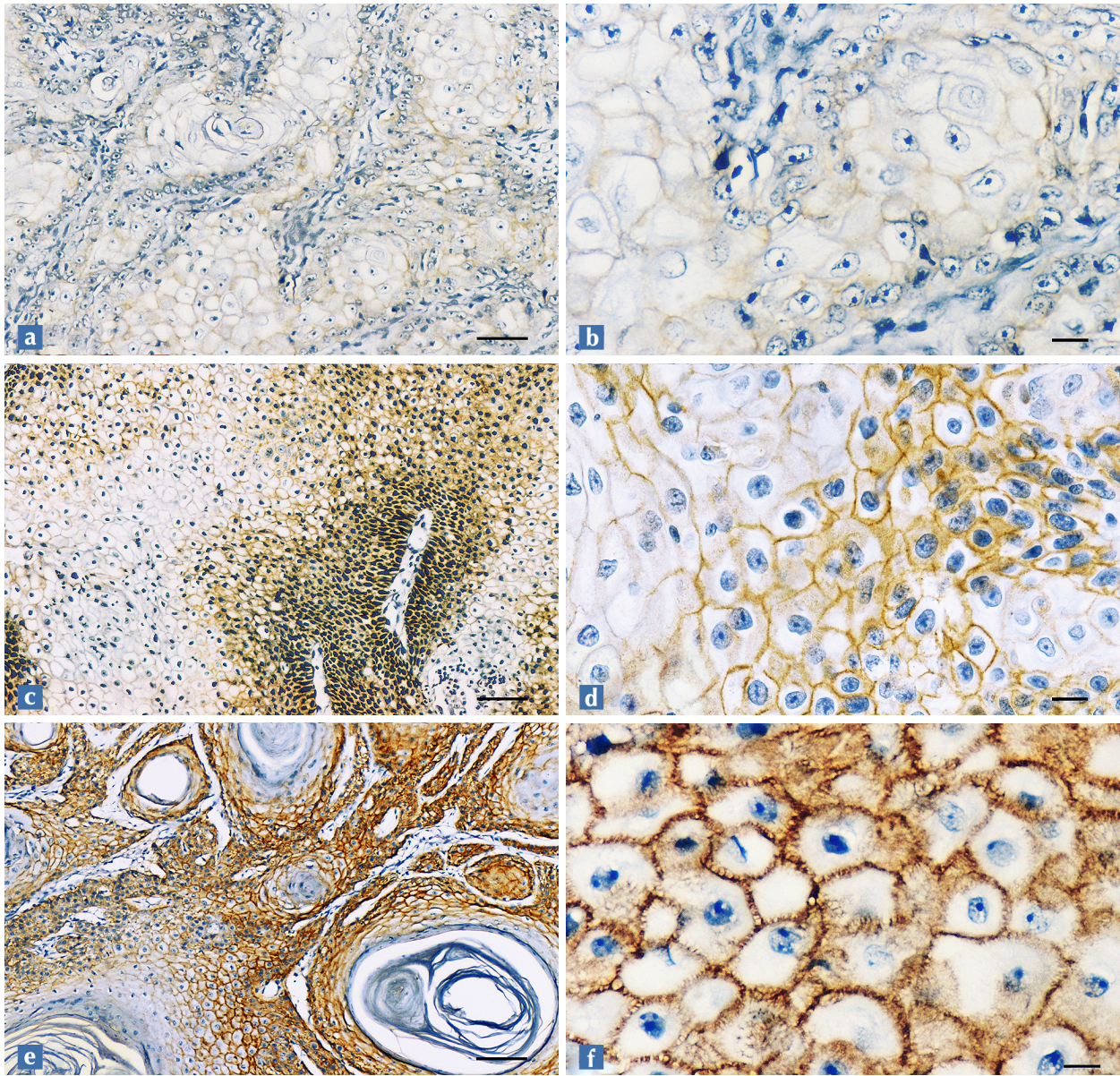


Figura 6.6 Immunocolorazione per EGFR. **(a, b)** Gatto. pinna auricolare. Carcinoma squamocellulare con debole positività di membrana estesa alla maggior parte delle cellule neoplastiche (EGFR-score, 4). **(c, d)** Gatto. Regione temporale. Carcinoma squamocellulare con moderata positività di membrana che interessa approssimativamente metà delle cellule neoplastiche (EGFR-score, 6). A più forte ingrandimento (d), si osserva una debole positività citoplasmatica in alcune cellule. **(e, f)** Gatto. Pinna auricolare. Carcinoma squamocellulare con intensa positività di membrana estesa alla maggior parte delle cellule neoplastiche (EGFR-score, 12). Contrasto con ematossilina di Papanicolau. Bar: 200 μ m (1a, 2a, 3a) e 25 μ m (1b, 2b, 3b).

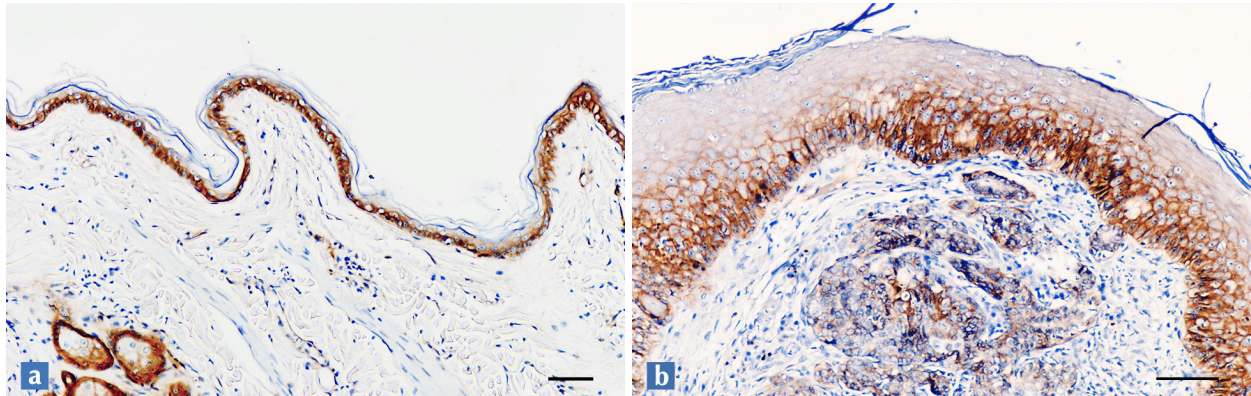


Figura 6.7 Immunocolorazione per EGFR. **(a)** Gatto. Cute normale. Intensa positività di membrana dello strato basale dell'epidermide. Contrasto con ematossilina di Papanicolaou. Bar: 100 μ m. **(b)** Gatto. Palpebra. Carcinoma squamocellulare. Intensa positività di membrana dell'epitelio iperplastico adiacente al tessuto neoplastico. L'intensità decresce progressivamente dallo strato basale allo strato corneo, che appare completamente negativo. Le cellule neoplastiche (al centro) sono solo debolmente positive. Contrasto con ematossilina di Papanicolaou. Bar: 200 μ m.

Tabella 6.2 Attività mitotica ed espressione di EGFR in 19 carcinomi squamocellulari (SCC) cutanei di gatto raggruppati in base alla differenziazione.

	Attività mitotica media (range) in 10 campi a 400x	Espressione di EGFR			
		Negativi (score = 0-2) N. casi (%)	Bassa (score = 3-5) N. casi (%)	Moderata (score = 6-8) N. casi (%)	Elevata (score = 9-12) N. casi (%)
SCC ben differenziati (n = 9; 47.4%)	27 (8 - 63)	4 (44.4%)	1 (11.1%)	3 (33.3%)	1 (11.1%)
SCC mediamente differenziati (n = 7; 36.8%)	30 (10 - 52)	0 (0%)	5 (71.4%)	0 (0%)	2 (28.6%)
SCC scarsamente differenziati (n = 3; 15.8%)	29 (14 - 42)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Totale (n = 19)	28 (8 - 63)	5 (26.3%)	7 (36.8%)	3 (15.8%)	4 (21.1%)

livello di positività era elevato (EGFR-score, 9-12). Il grado di differenziazione tumorale e l'attività mitotica non erano correlate all'EGFR status (positivo/negativo) né all'EGFR-score.

L'espressione di EGFR nei 6 campioni di cute di controllo era intensa e confinata allo strato basale dell'epidermide (Figura 6.6). Al contrario, l'epitelio displastico adiacente alla neoplasia (disponibile in 12 casi) presentava una positività estesa anche agli strati

soprabasali, con occasionale tendenza ad interessare tutti gli strati (**Figura 6.7**).

Analisi della sopravvivenza

Tutti i gatti sono stati sottoposti a intervento chirurgico, in 6 casi (32%) unicamente a scopo palliativo (mancata rimozione completa della/e neoplasia/e). Nessun animale ha ricevuto chemioterapia o radioterapia prima o dopo l'intervento. In nessun caso è stata ri-

Tabella 6.3 Segnalamento, esposizione a fattori di rischio, informazioni cliniche e valutazioni istologiche in 5 casi di carcinoma squamocellulare (SCC) cutaneo di gatto EGFR-negativi e 14 casi EGFR-positivi.

Parametri	SCC EGFR negativi (n = 5)	SCC EGFR positivi (n = 14)	P
Rapporto maschi : femmine	2:3	7:7	0.556
Età media (range)	7 (1 – 16) anni	10 (3 – 17) anni	0.209
Colore del mantello			0.556
<i>Completamente bianco</i>	2	7	
<i>Non completamente bianco</i>	3	7	
Ambiente di vita			0.519
<i>Prevalentemente all'aperto</i>	3	10	
<i>Prevalentemente domestico</i>	2	4	
Molteplicità			0.664
<i>Neoformazione solitaria</i>	3	8	
<i>Neoformazioni multiple</i>	2	6	
Diametro medio (range)	1 (0.5 – 2) cm	1.5 (0.5 – 3) cm	0.701
Differenziazione			0.226
<i>SCC ben differenziati</i>	4	5	
<i>SCC mediamente differenziati</i>	0	7	
<i>SCC scarsamente differenziati</i>	1	2	
Numero di mitosi in 10 campi a 400x			0.308
<i>Media</i>	36	26	
<i>Mediana</i>	42	24	
<i>Range</i>	8 – 63	10 – 52	
Sopravvivenza			0.022
<i>Gatti vivi a 24 mesi dalla diagnosi</i>	5	5	
<i>Gatti deceduti a causa del SCC entro 24 mesi dalla diagnosi</i>	0	9	

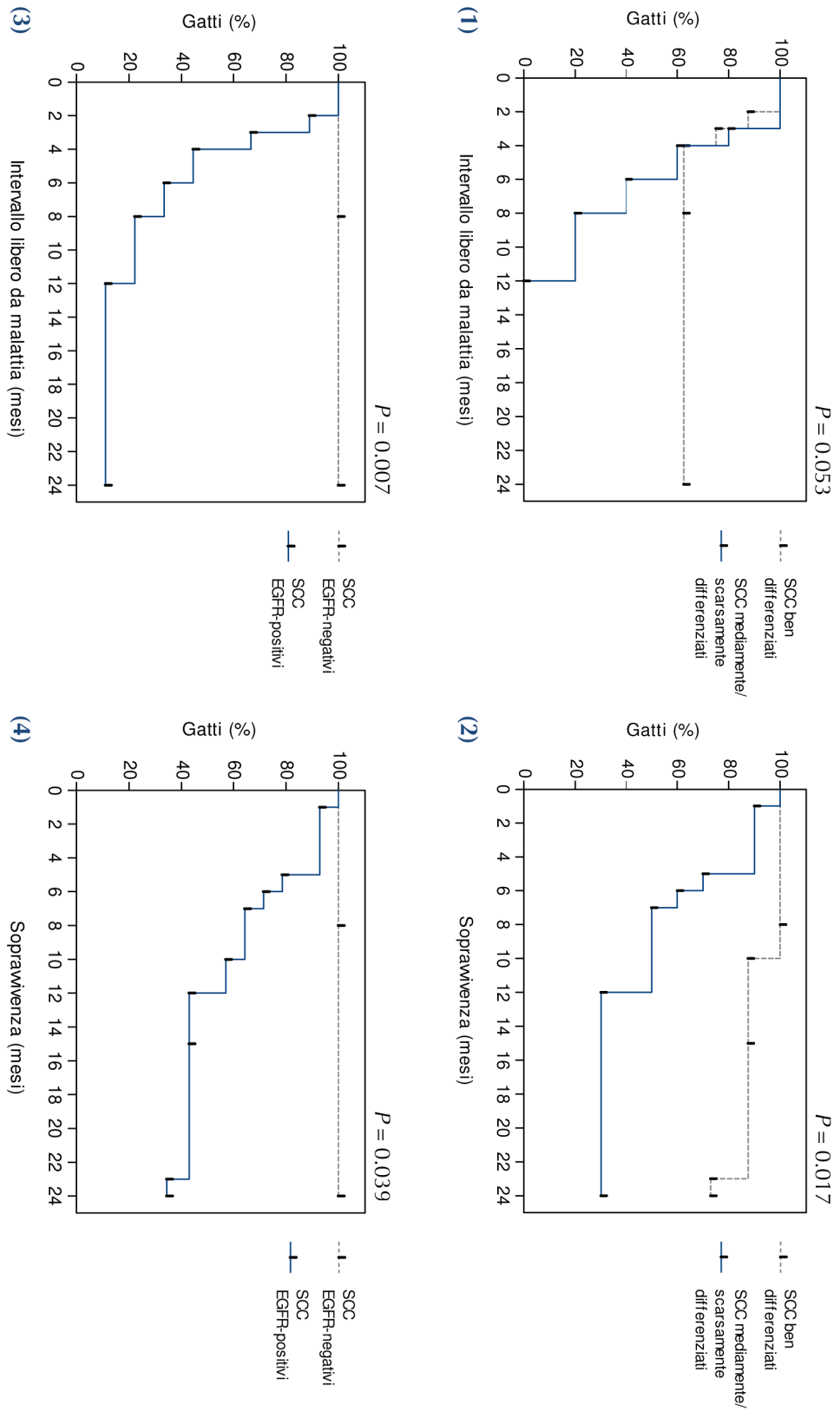


Figura 6.7
 Curve di Kaplan-Meier per l'intervallo libero da malattia e la sopravvivenza in base al grado di differenziazione (1 e 2) e all'espressione di EGFR (3 e 4) in 19 gatti con carcinoma squamocellulare cutaneo.

portata la comparsa di metastasi post-operatorie; recidive loco-regionali sono insorte in 8 di 13 casi (62%) in cui era stata effettuata una chirurgia a scopo curativo (ID 2, 4, 8, 10, 13, 15, 17 e 19), con un intervallo libero da malattia medio di 12.8 mesi (*range*, 5-24 mesi) (**Tabella 6.3**).

Nove gatti sono stati soppressi a causa delle recidive loco-regionali ($n = 6$; ID 2, 4, 8, 10, 13 e 19) o del progressivo aggravarsi della malattia nei casi dove era stata praticata una chirurgia palliativa ($n = 3$; ID 3, 5 e 14). Nei casi ad esito sfavorevole la sopravvivenza media è stata di 9 mesi (*range*, 1-23 mesi) (**Tabella 6.3**). Due gatti sono deceduti per cause estranee al SCC (ID 15 e 16).

Non sono emerse differenze significative riguardo a segnalamento, colore del mantello, ambiente di vita dei gatti e dimensioni, molteplicità, differenziazione e attività mitotica delle neoplasie in base all'EGFR *status*; i gatti con tumore EGFR-positivo sono andati più frequentemente incontro ad esito sfavorevole, con 9 di 14 pazienti (64%) deceduti prima della fine del periodo di osservazione, mentre nessun decesso è stato riscontrato nel gruppo dei casi EGFR-negativi ($P = 0.022$) (**Tabella 6.3**). Non sono state osservate differenze significative nei parametri istopatologici in base all'EGFR-*score*.

Sono state inoltre rappresentate curve di *Kaplan-Meier* per l'analisi univariabile dell'intervallo libero da recidiva e della sopravvivenza in base alla differenziazione dei tumori, all'attività mitotica e all'espressione di EGFR (**Figura 6.7**). Dall'analisi è emerso un ruolo prognostico negativo dell'espressione di EGFR (intervallo libero, $P = 0.007$; sopravvivenza, $P = 0.039$) e della perdita di differenziazione squamosa (intervallo libero, $P = 0.053$; sopravvivenza, $P = 0.017$), mentre l'attività mitotica non è risultata correlata alla prognosi.

6.4 Discussione

Questo studio è stato condotto allo scopo di caratterizzare l'espressione immunoistochimica di EGFR nel carcinoma squamocellulare cutaneo del gatto in relazione a grado di differenziazione, attività mitotica e comportamento biologico. Dai risultati è emerso come l'espressione di EGFR, benché non direttamente correlata alla differenziazione e all'attività mitotica, sia associata a una diminuzione dell'intervallo libero da malattia e dei tempi di sopravvivenza.

L'attivazione di EGFR e la fosforilazione del suo dominio intracellulare tirosin-chinasico innescano nella cellula una sequenza di segnali a cascata che determinano la trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di differenziazione, proliferazione, motilità e sopravvivenza cellulare [Marmor *et al.*, 2004]. Nel SCC dell'uomo è stata dimostrata una forte relazione tra espressione di EGFR da parte delle cellule neoplastiche e comportamento biologico più aggressivo, scarsa risposta alla terapia e prognosi infausta [Grandis *et al.*, 1996; Milas *et al.*, 2004; Ang *et al.*, 2002]. In campo veterinario, una positività per

EGFR è stata osservata in 9 di 13 (69%) SCC orali di gatto e in 2 di 3 (66%) SCC nasali di cane, ma le potenziali correlazioni con il grado di differenziazione tumorale, l'attività proliferativa o la prognosi non sono mai state indagate [Looper *et al.*, 2006; Shiomitsu *et al.*, 2009].

In accordo con quanto riportato in letteratura, nel nostro studio è stata evidenziata una positività per EGFR in 14 di 19 (74%) SCC cutanei di gatto. Il *pattern* di espressione era prevalentemente di membrana, con occasionale, debole positività citoplasmatica. A differenza di quanto rilevato per altri recettori tirosinchinasici in altre neoplasie (ad esempio *Kit* nei mastocitomi di cane e di gatto), una localizzazione intracellulare di EGFR non è mai stata messa in relazione a disregolazioni o alterazioni geniche [Piyathilake *et al.*, 2002]. L'espressione citoplasmatica di EGFR è riportata anche in tessuti non neoplastici [Adams *et al.*, 1999] ed è coerente con la sua natura di recettore transmembranario: in seguito all'instaurarsi del legame, il recettore subisce infatti un'internalizzazione per poter essere riutilizzato o eliminato dalla cellula [Srinivasan *et al.*, 1998]. Inoltre la presenza di EGFR a livello citoplasmatico potrebbe riflettere una neosintesi della molecola nell'apparato di Golgi [Damjanov *et al.*, 1986].

Oltre ai SCC, l'espressione di EGFR è stata valutata anche in campioni di cute normale e nell'epitelio iperplastico/displastico peritumorale. Tutti i campioni osservati sono risultati EGFR-positivi, con un'intensità equivalente o superiore rispetto al tessuto neoplastico. L'espressione di EGFR da parte di una sottopopolazione di cellule tumorali potrebbe pertanto essere interpretata come una maggiore somiglianza fenotipica di queste cellule nei confronti delle cellule di origine e non necessariamente come il risultato di una sovraregolazione o disregolazione. Si raccomanda pertanto prudenza nell'uso del termine 'sovraespressione' in riferimento all'EGFR nei SCC, a meno che non si effettui una valutazione quantitativa che permetta di comparare i livelli di positività delle cellule tumorali con quelli delle cellule equivalenti normali.

Considerando il ruolo primario di EGFR nel controllo della differenziazione cellulare e nel mantenimento di un *pool* di cellule basali in proliferazione negli epiteli non neoplastici, era inoltre attesa una correlazione tra espressione del recettore e differenziazione tumorale e/o attività proliferativa. In uno studio di Sheikh Ali *et al.* (2008), gli HNSCC con scarso o moderato grado di differenziazione mostravano una maggiore espressione di EGFR; nel nostro studio tale relazione non è emersa; inoltre, tutti i tumori presentavano un'attività mitotica da moderata a elevata, senza alcun rapporto con la modulazione dell'espressione di EGFR o la differenziazione tumorale.

L'analisi della sopravvivenza ha tuttavia evidenziato una prognosi più sfavorevole sia nei tumori che esprimevano EGFR che in quelli scarsamente differenziati. Una possibile ipotesi per giustificare l'indipendenza di questi parametri è che l'attivazione di EGFR condizioni il comportamento biologico della neoplasia agendo su fattori diversi, come l'apoptosi, la durata del ciclo cellulare e/o la motilità cellulare, o in alternativa il ridotto numero di casi ha limitato la potenza statistica della nostra analisi. Saranno necessari ulteriori studi che permettano di testare l'indipendenza dell'espressione di EGFR rispetto

alla differenziazione cellulare su una popolazione più numerosa.

Non esiste un sistema di *scoring* standardizzato per la valutazione della positività IIC per EGFR. In questo studio l'immunopositività è stata quantificata applicando un punteggio che tenesse conto sia dell'intensità del segnale che della percentuale di cellule positive, sovrapponibile ad altri già utilizzati nel HNSCC e negli studi precedenti in medicina veterinaria, basato sul metodo per la valutazione IIC della COX-2 [Pestili de Almeida, 2001; Beam *et al.*, 2003; Looper *et al.*, 2006; Shiomitsu *et al.*, 2009]. Tuttavia, nonostante i gatti con tumori EGFR-positivi presentassero una riduzione significativa dei tempi di sopravvivenza, non sono state evidenziate differenze nel comportamento biologico rispetto alla modulazione dell'espressione. La necessità e la rilevanza prognostica di un sistema di *scoring* per quantificare il livello di positività per EGFR dovrebbero essere indagate su una popolazione più ampia.

Oltre 20 EGFR-inibitori sono attualmente in fase di sperimentazione in medicina umana [Lurje e Lenz, 2010]; tuttavia, l'espressione immunoistochimica del recettore è solo parzialmente validata come metodo di selezione dei pazienti da sottoporre ai *trial* terapeutici, e sono stati segnalati diversi casi di HSSCC EGFR-negativi sensibili alla terapia con inibitori, per cui la metodica immunoistochimica viene generalmente associata alla ricerca di sovraregolazioni o mutazioni geniche (FISH, analisi mutazionale) [Parra *et al.*; 2004]. La limitata affidabilità della metodica immunoistochimica potrebbe essere dovuta alla mancata standardizzazione del procedimento e del metodo di valutazione oppure ad una incompleta comprensione della biologia di EGFR e del suo ruolo nel processo neoplastico. La standardizzazione della procedura e del metodo di valutazione sono in ogni caso un punto di partenza per definire il ruolo predittivo dell'espressione immunoistochimica di EGFR. La nostra scelta di condizioni di laboratorio e metodo di valutazione congruenti a quelle presentate nei recenti lavori in medicina veterinaria vuole essere un tentativo in questa direzione.

6.5 Conclusioni

I nostri risultati suggeriscono un'implicazione delle vie del segnale EGFR-dipendenti nella patogenesi del SCC cutaneo felino e il livello di espressione immunoistochimica della proteina ha dimostrato di influenzare i tempi di sopravvivenza. Nonostante la rassegna di casi considerati non sia sufficientemente ampia per trarre conclusioni di carattere definitivo, riteniamo che dalla valutazione combinata di grado di differenziazione ed espressione di EGFR possano essere ricavate importanti indicazioni prognostiche. L'elevata percentuale di SCC esprimenti EGFR in questo studio e in studi precedenti suggerisce inoltre le potenzialità di approcci terapeutici che prevedano l'inibizione delle vie di trasduzione del segnale EGFR-mediato.

Bibliografia

- Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *Journal of Clinical Pathology* 1999; **52**: 75-77.
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Research* 2002; **62**: 7350-7356.
- Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, McDonough SP. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasm. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 496-500.
- Damjanov I, Mildner B, Knowles B. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Laboratory Investigation* 1986; **55**: 588-592.
- Favrot C, Welle M, Heimann M, Godson DL, Guscetti F. Clinical, histologic and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 25-33.
- Goldschmidt MH, Shofer FS. Squamous cell carcinoma. In: *Skin tumors of the dog and the cat*. 1st edn. New York: Pergamon Press, 1992: 37-50.
- Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Twardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996; **78**: 1284-1292.
- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 2004; **11**: 689-708.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M and Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 2003; **Suppl 1**: S29-42.
- Holden JA, Willmore-Payne C, Layfield LJ. Tyrosine kinase activating mutations in human malignancies: implications for diagnostic pathology. *Experimental Molecular Pathology* 2008; **85**: 68-75.
- Looper JS, Malarkey DE, Ruslander D, Proulx D, Thrall DE. Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; **4**: 33-40.
- Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2010; **77**: 400-410.
- Marmor MD, Kochupurakkal BS, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB7HER Receptors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004; **58**: 903-913.
- Milas L, Fan Z, Andrantschke NH, Ang

- KK. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004; **58**: 966-971.
- Miller MA, Nelson SL, Turk JR, *et al.* Cutaneous neoplasia in 240 cats. *Veterinary Pathology* 1991; **28**: 389-95.
- Nelson EG, Grandis JR. Aberrant kinase signalling: lessons from head and neck cancer. *Future Oncology* 2007; **3**: 353-361.
- Ogilvie GK, Moore AS. *Feline oncology. A Comprehensive Guide to Compassionate Care* Trenton: Veterinary Learning Systems, 2001.
- Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology* 2005; **124**: 71-76.
- Parra HS, Cavina R, Latteri F, *et al.* Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2004; **91**: 208-212.
- Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2001; **49**: 867-875.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, *et al.* Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung. *Clinical Cancer Research* 2002; **8**: 734-744.
- Sheik Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, *et al.* Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science* 2008; **99**: 1589-1594.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumors. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; **7**: 106-114.
- Srinivasan R, Poulson R, Hurst H, Gullick W. Expression on the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumor types. *Journal of Pathology* 1998; **185**: 236-245.

Pubblicazioni scientifiche derivate da questo studio:

“Epidermal growth factor receptor expression is predictive of poor prognosis in feline cutaneous squamous cell carcinoma”. **Sabattini S**, Marconato L, Zoff A, Morini M, Scarpa F, Capitani O, Bettini G. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; 12(10): 760-8.

“EGFR expression is predictive of a poor prognosis in feline cutaneous squamous cell carcinoma”. **Sabattini S**, Zoff A, Morini M, Scarpa F, Capitani O, Marconato L, Bettini G. *Proceedings of the 2010 Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology (ESVONC)*; p 82; 18-20 March 2010, Turin, Italy.

EGFR e cancerogenesi da inquinamento atmosferico nei tumori polmonari primitivi del cane

7.1 Introduzione

Il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR o ErbB1) è una proteina transmembrana ad attività tirosinchinasica, normalmente espressa in molti tessuti di origine epiteliale. L'interazione con i ligandi specifici (EGF, TGF) determina la trasduzione al nucleo di segnali implicati nei meccanismi di differenziazione, proliferazione e apoptosi cellulare [Rosanda *et al.*, 2008].

Un'alterazione della regolazione dell'attività del recettore, e quindi la rottura dell'equilibrio tra processi di crescita e di morte cellulare a favore dell'iperproliferazione, può rappresentare l'input allo sviluppo di tumori di origine epiteliale [Prigent *et al.*, 1992]. EGFR può quindi rappresentare un importante bersaglio nella terapia anti-neoplastica [Parra *et al.*, 2004]. L'abnorme attività di EGFR nelle cellule tumorali ha portato allo studio e allo sviluppo di nuovi farmaci e agenti biologici in grado di bloccare in modo specifico l'attività del recettore, e quindi lo sviluppo delle cellule neoplastiche [Baselga, 2001].

EGFR è sovraespresso nel 40-80% dei carcinomi polmonari non microcistici (NSCLC) dell'uomo e nelle lesioni polmonari preneoplastiche, dove aumenta in modo proporzionale alla gravità della displasia [Hirsch *et al.*, 2003, Pao *et al.*, 2004]. La sovraespressione immunoistochimica (IIC) di EGFR è correlata a un'elevata trascrizione di mRNA, ed è pertanto un potenziale indicatore di sviluppo e progressione neoplastica.

I carcinomi polmonari primitivi (CPP) sono piuttosto rari nel cane, ma la loro incidenza è in continuo aumento. Questa tendenza è in parte do-

vuta al miglioramento delle tecniche diagnostiche, alla maggiore disponibilità di dati necroscopici e ad un aumento della vita media degli animali da compagnia, ma potenzialmente anche alla diffusione sempre maggiore di inquinanti ambientali. Studi epidemiologici hanno suggerito un ruolo causale di fattori legati alla convivenza con l'uomo, quali l'esposizione al fumo di tabacco e l'ambiente di vita urbano [Auerbach *et al.*, 1970; Reif e Cohen, 1971; Ogilvie *et al.*, 1989a]. Inoltre una maggiore incidenza di CPP è stata segnalata nelle razze brachicefale, probabilmente a causa di una ridotta capacità di filtrazione della mucosa nasale [Reif *et al.*, 1992] e nei cani di piccola taglia, per una più stretta condivisione dell'ambiente domestico con i proprietari [Roza e Viegas, 2007]. Uno studio istologico ha recentemente dimostrato un legame tra l'accumulo a livello polmonare di polveri particolate derivanti dall'esposizione cronica ad inquinanti atmosferici (antracosi) e la tendenza a sviluppare neoplasie del polmone [Bettini *et al.*, 2010].

In letteratura sono riportati diversi fattori prognostici per i CPP del cane, tra cui stadio clinico, dimensioni del tumore, coinvolgimento linfonodale, presenza di versamento pleurico, sintomi evidenti e grado istologico [Ogilvie *et al.*, 1989b; McNiel *et al.*, 1997; Withrow, 2007]. Tuttavia non sono ad oggi disponibili presidi terapeutici che portino ad un significativo miglioramento delle aspettative di vita del paziente.

È fondamentale una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo delle neoplasie polmonari primitive per garantire una più efficace prevenzione e terapia. Questo studio è stato condotto al fine di valutare l'espressione di EGFR nei carcinomi polmonari primitivi del cane e il suo potenziale ruolo nella patogenesi e progressione tumorale. A tale scopo sono state valutate le eventuali correlazioni tra EGFR e diversi parametri clinicopatologici, tra cui stadio clinico, grado istologico di malignità, presenza di antracosi polmonare e sopravvivenza.

7.2 Materiali e Metodi

Criteri di selezione e informazioni cliniche

È stato svolto uno studio retrospettivo su materiale di archivio relativo a casi di carcinomi polmonari primitivi di cane pervenuti al Servizio Diagnostico di Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. I casi raccolti sono stati sottoposti a nuova osservazione istologica per la conferma della diagnosi, e l'origine primitiva delle neoplasie è stata stabilita mediante reperti clinici o necroscopici, e sulla base della positività al marker immunoistochimico TTF-1 [Ramos-Vara *et al.*, 2005; Bettini *et al.*, 2008].

Sono stati inclusi nello studio solo casi corredati da sufficienti dati clinico-anamnestici: sesso, età alla diagnosi, razza, presenza di sintomatologia, sindromi pa-

Tabella 7.1 Valutazione dell'esposizione a potenziali fattori di rischio in una popolazione di 37 cani affetti da tumore polmonare primitivo.

Ambiente di vita prevalente	<p>Urbano - Area al centro di un grande nucleo cittadino, ad elevata densità abitativa</p> <p>Suburbano – Distretto residenziale localizzato nell'<i>hinterland</i> cittadino, a media densità abitativa, in prossimità di aree verdi</p> <p>Rurale – Area a bassa densità abitativa, deputata prevalentemente ad attività agricole</p>	
Esposizione a fumo di tabacco	<p>Tempo giornaliero che il cane trascorre in casa</p> <p>Numero di sigarette fumate giornalmente dai proprietari all'interno dell'abitazione</p>	<p>0 – Vive solo all'aperto</p> <p>1 – Fino a 8 ore al giorno</p> <p>2 – Più di 8 ore al giorno</p> <p>3 – Esce esclusivamente per brevi passeggiate</p> <p>0 – Nessuna</p> <p>1 – Meno di 5</p> <p>2 – Tra 5 e 10</p> <p>3 – Tra 10 e 20</p> <p>4 – Tra 20 e 30</p> <p>5 – Più di 30</p>

raneoplastiche, alterazioni ematologiche, trattamento ricevuto, evoluzione della malattia e sopravvivenza. Per i meticci sono state raccolte informazioni relative alla conformazione del cranio e alla taglia. Mediante interviste telefoniche ai proprietari sono state ottenute informazioni riguardanti l'ambiente di vita prevalente e l'esposizione al fumo passivo, come riportato in **Tabella 7.1**.

La localizzazione del tumore, il diametro maggiore e lo stadio TNM sono stati stabiliti sulla base dell'esame clinico, mediante il supporto della diagnostica per immagini, o sulla base dei reperti autoptici [Owen, 1980]. Nei casi che presentavano neoformazioni multiple è stata selezionata per le successive indagini quella di dimensioni maggiori e il tumore è stato classificato come multinodulare.

Esame istologico

Per ciascun caso selezionato sono stati stabiliti l'istotipo prevalente in base alle linee guida fornite dal WHO [Dungworth *et al.*, 1999] e il numero totale di mitosi per 10 campi a 400x. Ove disponibile una quantità sufficiente di tessuto neoplastico, è stato

inoltre valutato il grado istologico di malignità secondo McNiel *et al.* (1997).

Espressione di EGFR

L'espressione di EGFR è stata valutata mediante esame immunohistochimico, utilizzando un anticorpo commerciale (EGFR Ab-10, clone 111.6, monoclonale di topo, *NeoMarkers*, Fremont, CA, USA), la cui reattività nei tessuti di cane era stata precedentemente testata [Shiomitsu *et al.*, 2009].

Il blocco delle perossidasi è stato ottenuto mediante incubazione in una soluzione di perossido di idrogeno al 3% in acqua distillata per 30 minuti, mentre la riepistituzione antigenica è avvenuta tramite digestione enzimatica: dopo un passaggio in TRIS a 37 °C per 5 minuti, le sezioni sono state incubate in una soluzione di proteasi XIV allo 0.05% (pH 7.5), per 15 minuti a 37°C. Il blocco della reazione è stato ottenuto mediante un successivo passaggio di 5 minuti in TRIS freddo. I campioni sono stati incubati con l'anticorpo anti-EGFR diluito 1:100 in PBS per un'ora in camera umida a 37°C. Previo lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate con un kit di rivelazione ad alta sensibilità (EnVision Plus-HRP™, *Dako*, Glostrup, Danimarca), secondo le istruzioni del prodotto. Le sezioni sono state poi risciacquate in PBS e in acqua corrente e in seguito colorate con ematossilina di Papanicolau, disidratate e montate mediante DPX™ (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Per i controlli negativi l'anticorpo primario è stato sostituito con un anticorpo aspecifico.

Il segnale atteso era di membrana. La percentuale di cellule neoplastiche positive è stata stabilita su base soggettiva, e a ciascun tumore è stato assegnato un EGFR *status* positivo se almeno il 10% di cellule era immunoreattivo. Per l'analisi della sopravvivenza, i tumori sono stati suddivisi in due gruppi in base al livello di espressione di EGFR, utilizzando la mediana come valore di *cut-off*. Quando possibile, l'espressione di EGFR è stata valutata anche su sezioni di tessuto polmonare adiacente non neoplastico (*background lung*).

Antracosi polmonare

Nei campioni con *background lung* disponibile sono stati quantificati i depositi di polveri particolate nerastre nel parenchima polmonare o nei macrofagi (antracosi). L'antracosi è stata misurata mediante analizzatore di immagine (LUCIA G™, *Nikon*, Tokyo, Giappone) e quantificata come area percentuale media occupata dai depositi di polveri sulla superficie totale del parenchima polmonare esclusi gli spazi aerei, valutata in 5 campi a 100x. Le valutazioni sono state effettuate nelle aree con maggiori concentrazioni di polveri particolate.

Analisi statistica

Un'analisi statistica dei dati è stata condotta per valutare

- l'espressione quali-quantitativa di EGFR nei carcinomi polmonari primitivi in relazione a istotipo prevalente, attività mitotica e grado istologico;

- la presenza di una eventuale correlazione tra espressione di EGFR, quantità di antracosi polmonare ed esposizione a potenziali fattori di rischio.

Per eseguire le valutazioni sono stati utilizzati il test esatto di Fisher, il test di Kruskal-Wallis per l'analisi della varianza e la correlazione per ranghi di Spearman.

È stata inoltre effettuata l'analisi della sopravvivenza univariata e multivariata (*log-rank* test, regressione dei rischi proporzionali di Cox) per identificare l'esistenza di fattori prognostici. La sopravvivenza è stata misurata come tempo (settimane) intercorso tra la diagnosi istologica e la morte. I cani in vita alla fine dello studio o morti per cause diverse dalla malattia neoplastica sono stati censurati. Le curve di sopravvivenza sono state generate secondo il metodo del prodotto limite di Kaplan-Meyer.

Il limite di significatività (*P*) è stato posto uguale o inferiore a 0.05. I test sono stati eseguiti con *SPSS Statistics*TM v. 19.0 (IBM, Somers, NY, USA) e *Prism*TM v. 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

7.3 Risultati

Segnalamento, anamnesi e presentazione clinica

In totale sono stati inclusi nella ricerca 37 cani con tumore polmonare primitivo (16 necroscopie, 7 biopsie escissionali e 14 biopsie incisionali).

Le informazioni anamnestiche non erano disponibili per tutti i casi, quindi per i dati riportati in seguito, la percentuale si riferisce di volta in volta al numero totale di cani per i quali i dati erano disponibili.

Dei 37 cani inclusi nello studio, 11 erano maschi (31%), 2 dei quali castrati, e 25 erano femmine (69%), 16 delle quali sterilizzate, il rapporto maschi-femmine era di 1:2.2. L'età media alla diagnosi era di 11 anni (mediana, 11.5; *range*, 5-15). Le razze maggiormente rappresentate sono state Boxer, Setter inglese, Dalmata e Schnauzer, per ognuna delle quali erano presenti 2 casi, mentre i meticci erano 14. I cani erano distribuiti omogeneamente per taglia, infatti cani di piccola ($n = 10$), media ($n = 10$) e grande taglia ($n = 11$) erano ugualmente rappresentati. I brachicefali erano in tutto 3, quindi rappresentavano il 9% dei soggetti inclusi nello studio.

È stato possibile raccogliere dati riguardanti l'esposizione a potenziali fattori di rischio in 23 casi. Otto cani (35%) provenivano da un ambiente urbano, 7 (30%) da aree suburbane e 8 (35%) da aree rurali. Cinque cani (22%) erano fortemente esposti al fumo di tabacco, in 5 cani (22%) l'esposizione è stata valutata da media a bassa, mentre 13 cani (56%) provenivano da abitazioni dove non erano presenti fumatori.

I segni clinici presentavano una durata variabile da 1 a 88 settimane prima della diagnosi. In due casi la diagnosi di CPP è stata del tutto accidentale e non pre-

ceduta da sintomi. La tosse, generalmente non produttiva, era il sintomo più frequentemente osservato, inoltre spesso i soggetti mostravano astenia, dispnea e anoressia (Tabella 7.2). Quattro cani su 36 (11%) sono andati incontro a versamento pleurico. In un caso i segni respiratori erano preceduti da osteopatia ipertrofica, mentre in due la sindrome paraneoplastica si è manifestata dopo la comparsa dei sintomi respiratori. In altri tre casi i proprietari hanno osservato zoppia e/o dolorabilità alle zampe, ma la radiologia non ha confermato la presenza di segni di osteopatia ipertrofica. L'alterazione ematologica più frequentemente riportata è stata la leucocitosi (conta dei globuli bianchi superiore a 20000/mm³), presente in 6 casi (40%), mentre nessun cane è andato incontro a ipercalcemia. In un caso sono stati riscontrati segni riferibili alla sindrome di Cushing (poliuria, polidipsia, polifagia, alopecia, debolezza muscolare), ma verosimilmente erano attribuibili alla somministrazione di corticosteroidi più che alla produzione ectopica di ACTH.

I tumori erano localizzati con maggior frequenza a livello di polmone destro ($n = 19$; 61%) e nel lobo caudale ($n = 13$; 46%) (Figura 7.1). Trentuno casi mostravano un *pattern* di crescita nodulare e 13 di questi (42%) erano multinodulari (Figure 7.2 e 7.3). In questi casi il diametro maggiore delle masse era compreso tra 2 e 22 cm (media, 7.8 cm; mediana, 6.2 cm). I restanti 4 casi (12%) presentavano invece un *pattern* infiltrativo, interessando più lobi, senza la possibilità di identificare una massa ben definita (Figura 7.4). In 10 casi (30%) vi era interessamento dei linfonodi to-

Tabella 7.2 *Sintomatologia alla diagnosi in 37 cani con tumore polmonare primitivo.*

Sintomo	N. cani (%)
Tosse	16 (55%)
Astenia/riluttanza all'esercizio fisico	8 (27.5%)
Dispnea/polipnea	7 (24 %)
Anoressia	6 (20.5%)
Zoppia	6 (20.5%)
Perdita di peso	2 (7%)
Altro	3 (10%)
Nessuno	2 (7%)

llo	$n = 1$; (3%)
Polmone sinistro	$n = 11$; (36%)
Polmone destro	$n = 19$; (61%)
Lobi apicali	$n = 9$; (35%)
Lobi diaframmatici	$n = 12$; (46%)
Lobi medi e accessori	$n = 5$; (20%)

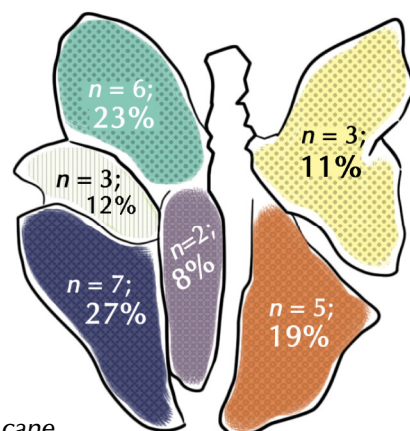


Figura 7.1 *Localizzazione di 26 tumori polmonari primitivi di cane.*

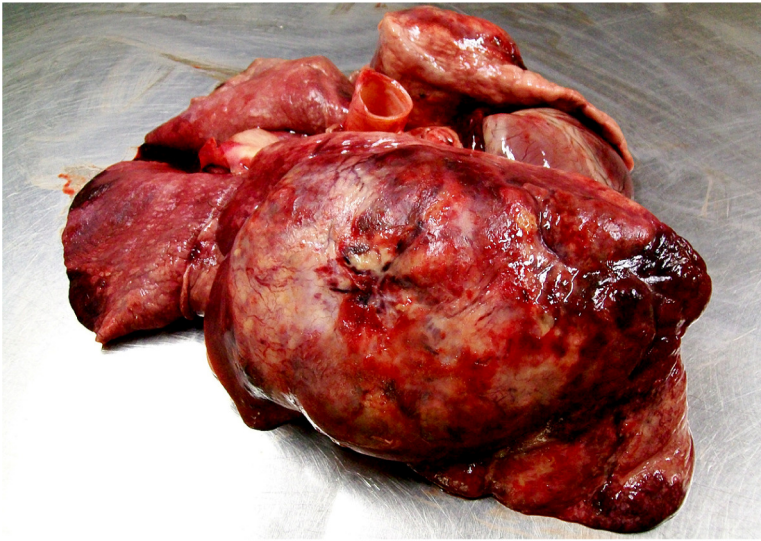


Figura 7.2
Cane. Polmone. Presenza di una neof ormazione nodulare di circa 20 cm di diametro a carico del lobo medio destro.

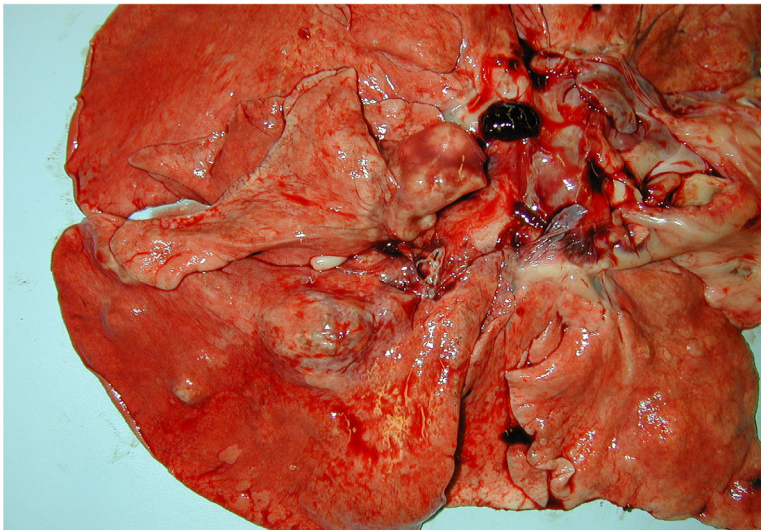


Figura 7.3
Cane. Polmone. Presenza di numerosi noduli di dimensioni variabili (pattern multinodulare).

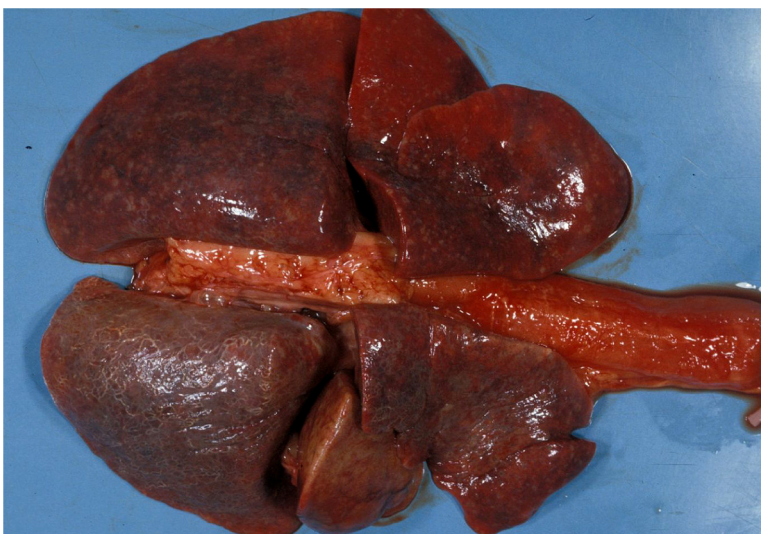


Figura 7.4
Cane. Polmone. Lobi estesamente infiltrati da un tessuto uniforme grigiastro, di consistenza compatta. Solo limitate aree di parenchima polmonare sono indenni (pattern diffuso).

racici, mentre metastasi a distanza erano presenti in 4 cani (11%); gli organi che mostravano metastasi erano fegato, reni, ghiandole surrenali, cuore ed encefalo. Al momento della diagnosi, 24 tumori erano in stadio I (70%), 6 in stadio II (18%), e 4 in stadio III (12%).

Esame istologico

A conferma dei dati riportati in letteratura, l'istotipo prevalente era l'adenocarcinoma (68%), sia con *pattern* papillare (54%) sia con *pattern* acinare (14%). Sette tumori sono invece stati classificati come carcinomi adenosquamosi, e 5 (13%) come carcinomi bronchioloalveolari (**Tabella 7.3; Figura 7.5**).

Il numero di mitosi contate per 10 campi a 400x variava in un *range* da 3 a 56 (media, 24; mediana, 20). I carcinomi adenosquamosi mostravano un'attività mitotica significativamente più alta (media, 39; mediana, 38) rispetto sia agli adenocarcinomi che ai carcinomi bronchioloalveolari ($P = 0.003$) (**Tabella 7.3**).

È stato possibile valutare il grado istologico di malignità in 25 casi, in quanto nei rimanenti casi la dimensione del campione non permetteva di apprezzare tutti i parametri morfologici previsti, 7 erano di grado I (28%), 12 di grado II (48%), e 6 di grado III (24%). Il grado istologico di malignità era significativamente più alto nei carcinomi adenosquamosi rispetto ai carcinomi bronchioloalveolari e agli adenocarcinomi ($P = 0.004$) (**Tabella 7.3**).

Campioni di *background lung* erano disponibili in 21 casi, e in 16 di questi erano presenti multifocali ispessimenti della muscolatura liscia dei bronchioli terminali e respiratori, associati a fibroplasia, innalzamento e pluristratificazione dell'epitelio di rivestimento (*lesioni iperplastiche*). In 6 casi l'architettura epiteliale era occasionalmente più disordinata, fino alla formazione di protrusioni papillari endoluminali, e le atipie cellulari erano più marcate (pleomorfismo nucleare, nucleoli prominenti, addensamenti cromatinici) (*lesioni displastiche*) (**Figura 7.5**).

Espressione di EGFR

È stata valutata l'espressione di EGFR mediante IHC in tutti i campioni, 28 dei quali (76%) sono risultati positivi. Il grado di positività era variabile all'interno dello stesso tumore: in una stessa sezione era spesso possibile osservare aree intensamente immunoreattive in continuità con aree scarsamente positive o negative. La variabilità di espressione di EGFR non era correlata al *pattern* di differenziazione dei tumori. Nei tumori che sono risultati positivi, la percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive variava dal 20% al 100% (media, 66%; mediana, 68%) (**Tabella 7.3; Figura 7.6**). Non è stata evidenziata nessuna differenza significativa in base all'istotipo né per quanto riguarda EGFR status, né per la percentuale di cellule immunoreattive (**Tabella 7.3**). Inoltre non è stato possibile evidenziare nessuna correlazione tra l'espressione di EGFR e il numero di mitosi o il grado istologico.

In 5 dei 21 casi con *background lung* disponibile (24%, tutti provenienti da tumori EGFR

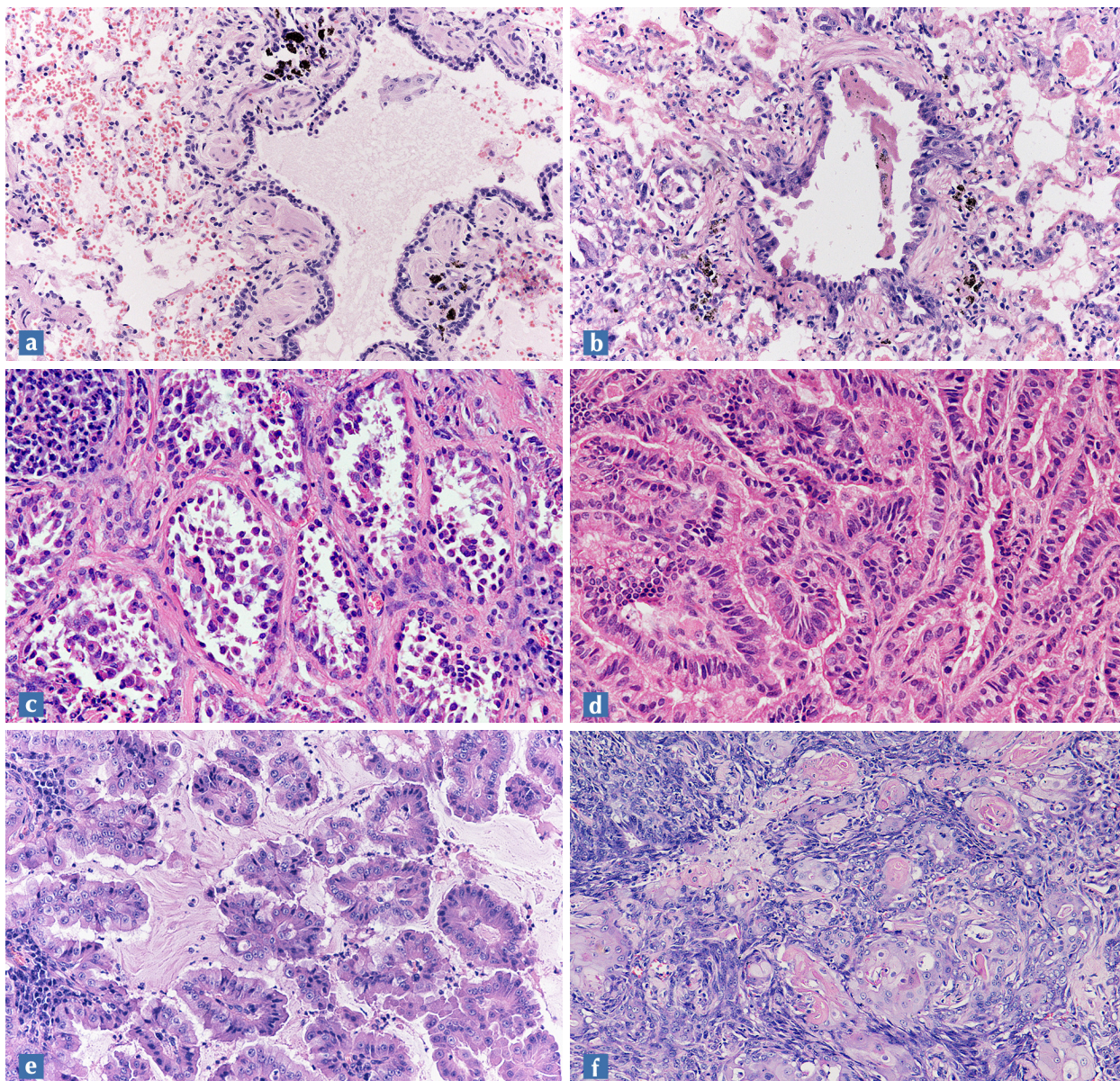


Figura 7.5 Sezioni istologiche di tessuto polmonare di cane. Lesioni iperplastiche (a) e displastiche (b) dell'epitelio bronchiolare. Principali istotipi di carcinoma polmonare primitivo: (c) carcinoma bronchioloalveolare; (d) adenocarcinoma papillare; (e) adenocarcinoma macinare; (f) carcinoma adenosquamoso. Ematossilina Eosina.

-positivi) era presente un segnale positivo all'EGFR nelle lesioni iperplastiche/displastiche a carico dell'epitelio bronchiale adiacente al tumore (**Figura 7.6**).

Nei polmoni di controllo è stato possibile apprezzare una positività intermittente a carico dello strato basale dell'epitelio bronchiale e delle ghiandole della sottomucosa (**Figura 7.6**).

Tabella 7.3 Istotipo, attività mitotica, grado istologico ed espressione di EGFR in 37 tumori polmonari primitivi di cane.

Istotipo	Att. mitotica ^a	Grado istologico ^b			Espressione di EGFR			Cellule tumorali positive
		I	II	III	Negativi	Espressione bassa ^c	Espressione elevata ^d	
	Media (range)	N. casi (%)			N. casi (%)	N. casi (%)	N. casi (%)	% media (range)
Adenocarcinomi (n = 25; 67.6%)	21 (3 – 43)	5 (38.5%)	7 (53.8%)	1 (7.7%)	5 (20%)	11 (44%)	9 (36%)	63% (20 – 100%)
Carcinomi adenosquamosi (n = 7; 18.9%)	39 (21 – 56)	0 (0%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	3 (42.8%)	1 (14.4%)	3 (42.8%)	79% (58 – 90%)
Carcinomi bronchioloalv. (n = 5; 13.5%)	16 (8 – 29)	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	66% (30 – 100%)
Totale (n = 37)	24 (3 – 56)	7 (28%)	12 (48%)	6 (24%)	9 (24.2%)	14 (37.8%)	14 (37.8%)	66% (20 – 100%)

^a Numero totale in 10 campi a forte ingrandimento (400x)

^b Secondo McNiel *et al.* (1997). Il numero totale dei casi non corrisponde a 37 perché in alcuni casi non è stato possibile definire il grado istologico in modo attendibile.

^c Percentuale di cellule tumorali positive ≤ mediana (68%).

^d Percentuale di cellule tumorali positive > mediana (68%).

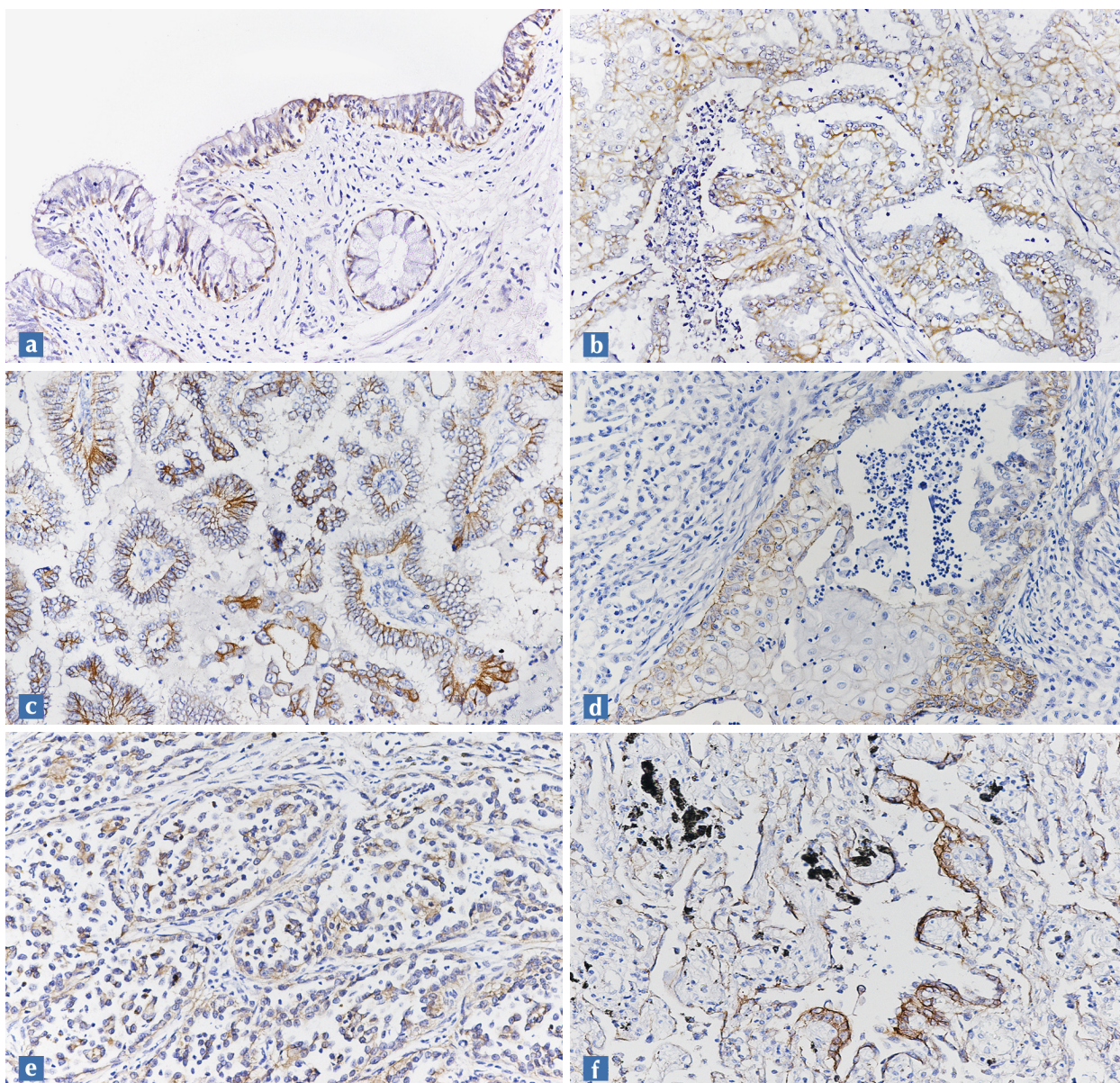


Figura 7.6 Espressione immunoistochimica di EGFR in sezioni di tessuto polmonare di cane. (a) Tessuto polmonare normale. Positività limitata allo strato basale dell'epitelio bronchiale e delle ghiandole della sottomucosa. (b, c, d, e) Tumori polmonari primitivi. Estrema variabilità di espressione di EGFR in assenza di una correlazione con il pattern istologico prevalente. (f) Occasionale positività delle lesioni iperplastiche e displastiche dell'epitelio bronchiolare associate al deposito di polveri antracotiche. Contrasto con Ematossilina di Papanicolaou.

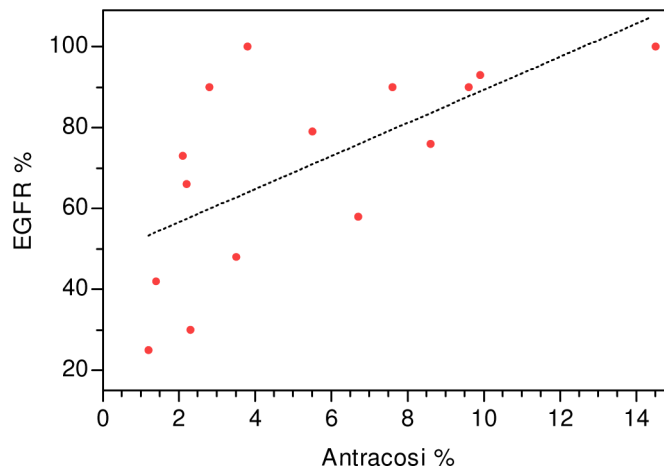


Figura 7.7 Retta di regressione lineare tra le variabili percentuale di cellule tumorali EGFR-positivo e percentuale di antracosi polmonare in 37 casi di tumore polmonare di cane ($R = 0.76$; $P = 0.002$).

Antracosi polmonare

In 17 dei 21 casi con *background lung* disponibile (81%), è stato possibile identificare una quantità variabile di antracosi, da un minimo di 1.2% ad un massimo di 14.5% (media, 5.4%; mediana, 4.1%). I depositi di antracosi erano spesso associati alle lesioni iperplastiche/displastiche del tessuto epiteliale dei bronchi e delle miofibre (Figura 7.5).

La proporzione di tumori EGFR positivi era significativamente maggiore nei polmoni con antracosi (15 casi su 17; 88%), infatti solamente uno dei tumori che non mostravano antracosi nel *background lung* è risultato comunque positivo per EGFR ($P = 0.028$). Inoltre, nei polmoni antracotici la percentuale di cellule tumorali EGFR-positivo era direttamente proporzionale alla quantità di antracosi accumulata ($R = 0.726$; $P = 0.002$) (Figura 7.7).

La quantità di antracosi e l'espressione di EGFR non sono risultati correlati all'esposizione ai fattori di rischio considerati in questo studio.

Analisi della sopravvivenza

Trenta cani (81%) non hanno ricevuto alcun trattamento oppure hanno ricevuto un trattamento esclusivamente palliativo (antibiotici, diuretici, erbe, corticosteroidi, anti-COX-2) in quanto lo stato della malattia era estremamente avanzato, oppure i proprietari si sono rifiutati di tentare un approccio chirurgico. Sette cani sono stati sottoposti ad intervento chirurgico, e in 2 di questi casi alla chirurgia ha fatto seguito un trattamento chemioterapico. Il periodo minimo di *follow-up* è stato di 12 settimane. Il tempo di sopravvivenza medio dalla diagnosi è stato di 12 settimane per i soggetti che non hanno subito l'intervento chirurgico e di 54 settimane in quelli in cui il tumore è stato asportato chirur-

Tabella 7.4 Analisi univariata dei fattori potenzialmente associati alla sopravvivenza (settimane dalla diagnosi al decesso) in 37 cani con tumore polmonare primitivo.

Parametri	N. cani ^a	Sopravvivenza media (giorni)	Sopravvivenza mediana (giorni)	P
Durata dei sintomi^b				0.178
≤ 7 settimane	11	28	32	
> 7 settimane	11	11	5	
Diametro maggiore^b				0.601
≤ 6.2 cm	15	28	5	
> 6.2 cm	14	17	4	
Numero di noduli				0.110
Solitari	18	24	6	
Multinodulari	17	7	1	
Interessamento linf. toracici				0.042
No	24	26	6	
Sì	10	3	1	
Metastasi a distanza				0.027
No	31	23	5	
Sì	4	1	1	
Stadio TNM				
I	24	26	6	
II	6	3	1	
III	4	4	1	0.134
I e II	24	26	6	
II e III	10	4	1	0.043
Istotipo				0.887
Adenocarcinomi	25	27	6	
Carcinomi adenosquamosi	7	1	1	
Carcinomi bronchioloalveolari	5	4	1	
Attività mitotica^b				0.752
≤ 20	19	21	4	
> 20	18	18	3	
Grado istologico				0.727
I	7	4	1	
II	12	25	1	
III	6	6	3	
EGFR status				0.800
Negativo	9	25	1	
Positivo	28	16	4	
Espressione di EGFR^b				0.048
≤ 68%	14	25	5	
> 68%	14	8	1	
Trattamento chirurgico				0.047
Sì	30	12	1	
No	7	54	32	

^a Il numero totale dei casi non corrisponde a 37 perché per alcuni cani i dati non erano disponibili.^b Popolazione suddivisa utilizzando la mediana come valore di *cut-off*.

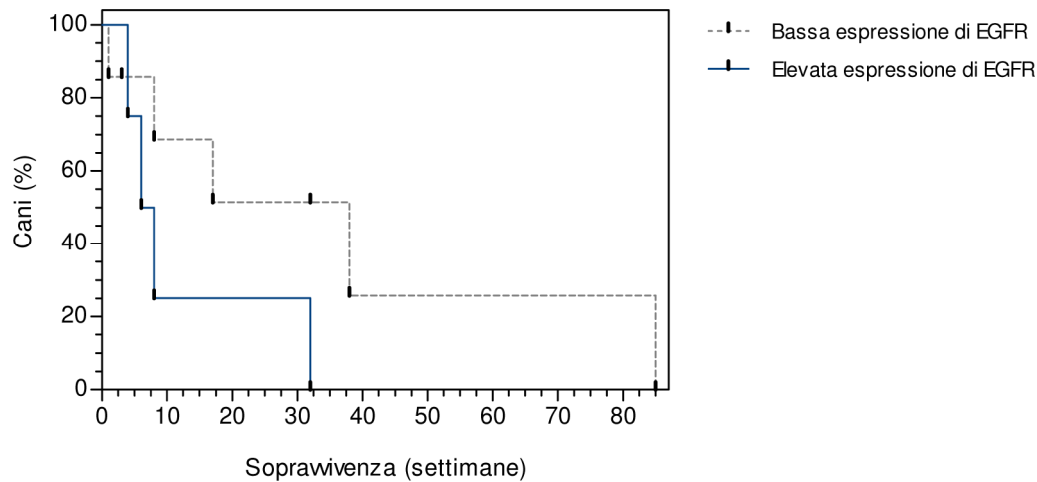


Figura 7.8 Curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier in una popolazione di 37 cani affetti da tumore polmonare primitivo in relazione all'espressione di EGFR ($P = 0.048$).

Tabella 7.5 Analisi proporzionale dei rischi relativi di Cox dei fattori potenzialmente associati alla sopravvivenza (settimane dalla diagnosi al decesso) in 37 cani affetti da tumore polmonare primitivo.

Parametri	Odds ratio	95% CI	P
Interessamento dei linfonodi toracici	2.17	0.67 – 7.01	0.195
Metastasi a distanza	1.50	0.27 – 8.51	0.645
Espressione di EGFR	2.48	1.12 – 10.78	0.036
Trattamento chirurgico	0.29	0.07 – 1.21	0.089

gicamente ($P = 0.047$). Oltre al mancato trattamento chirurgico, altre variabili che si sono rivelate fattori prognostici negativi all'analisi univariata della sopravvivenza sono state: coinvolgimento dei linfonodi toracici ($P = 0.042$), presenza di metastasi a distanza ($P = 0.027$), stadio clinico superiore a I ($P = 0.043$) ed elevata espressione di EGFR ($P = 0.048$) (**Tabella 7.4; Figura 7.8**). I suddetti fattori sono stati compresi contemporaneamente in un modello di analisi multivariata, e solo l'espressione di EGFR è risultata ancora associata a una ridotta sopravvivenza (*odds ratio*, 2.48; CI, 1.12-10.78; $P = 0.036$) (**Tabella 7.5**).

7.4 Discussione

In questo studio sono state riportate le principali caratteristiche clinicopatologiche osservate in 37 cani affetti da CPP, è stata inoltre valutata con particolare attenzione l'espressione di EGFR e il suo potenziale valore patogenetico e prognostico.

Nel nostro studio, le femmine erano circa il doppio dei maschi; altri studi riportano questa tendenza [Ogilvie *et al.*, 1989a; McNiel *et al.*, 1997], mentre alcuni autori non hanno evidenziato nessuna predisposizione di sesso [Polton *et al.*, 2008]. Inoltre abbiamo osservato come il polmone destro fosse più frequentemente colpito da CPP, in particolare a carico del lobo caudale, il che ancora conferma i dati riportati in letteratura [Moulton *et al.*, 1981, Nii *et al.*, 1985]. Questo è probabilmente imputabile alle caratteristiche anatomiche che si riscontrano nel cane, infatti il polmone destro ha un volume maggiore rispetto al sinistro e il lobo caudale è il più sviluppato; inoltre il bronco principale destro ha un diametro leggermente maggiore e l'angolo che si forma tra questo e la trachea è più ottuso rispetto al controlaterale [Smith, 1999]. La nostra casistica non ha invece confermato la predisposizione dei cani brachicefali o di piccola taglia allo sviluppo di tumore polmonare primitivo, segnalata in alcuni studi precedenti [Rief *et al.*, 1992; Roza e Viegas, 2007].

In uno studio precedentemente condotto è stato evidenziato un rapporto tra lo sviluppo di neoplasie polmonari nel cane e l'esposizione a polveri ambientali: nel tessuto polmonare proveniente da 35 cani con CPP è stato possibile evidenziare una concentrazione di antracosi significativamente superiore nel *background lung* rispetto a quanto è stato osservato in una popolazione di controllo composta da 160 cani. Inoltre nei campioni di tessuto polmonare non neoplastico che presentavano abbondanti depositi di polveri particolate, si poteva osservare la presenza di aree di iperplasia dell'epitelio bronchiolare, di possibile significato pre-neoplastico [Bettini *et al.*, 2010].

Nel presente studio, che ha in parte utilizzato i casi del precedente (17 casi) è stata confermata un'elevata quantità di antracosi nel *background lung* in quasi tutti i cani affetti da CPP (81%). Il confronto fra anamnesi ambientale (ambiente di vita, esposizione a fumo passivo) e antracosi non ha evidenziato una diretta correlazione, a dimostrazione di come i dati epidemiologici non sempre riescano a descrivere l'effettiva esposizione ai fattori di rischio. Nel caso dell'antracosi, per esempio, l'ambiente di vita urbano o rurale non erano correlati alla quantità di particelle inquinanti effettivamente inalate e depositate nei polmoni.

Le particelle di polveri particolate veicolano sostanze chimiche (idrocarburi aromatici policiclici, metalli pesanti) in grado di promuovere la formazione di radicali liberi che danneggiano le membrane cellulari. È proprio questo danno da stress ossidativo che viene considerato il fattore attivante il segnale di trasduzione EGFR-dipendente, che regola i processi di differenziazione, migrazione, adesione, trasformazione e inibizione dell'apoptosi, e favorisce quindi lo sviluppo di una neoplasia [Mehta *et al.*, 2008; Weis-

semerberg *et al.*, 2010].

È stato dimostrato come l'evidenziazione immunoistochimica di una marcata positività per EGFR corrisponda ad elevati livelli di mRNA, e quindi rappresenti un indicatore di attivazione del recettore. L'abnorme espressione immunoistochimica di EGFR è stata già dimostrata in diversi tumori animali [Looper *et al.*, 2006; Dickinson *et al.*, 2006; Shiomitsu *et al.*, 2009; Gama *et al.*, 2009; Sabattini *et al.*, 2010]; nei tumori polmonari primitivi del cane, uno studio del 1992 ha evidenziato una espressione di EGFR da moderata ad elevata nel 47% dei CPP indotti sperimentalmente mediante esposizione a plutonio e nel 15 % delle lesioni preneoplastiche [Gillet *et al.*, 1992].

In questo studio il 76% dei CPP è risultato EGFR-positivo, e il numero di tumori positivi era significativamente maggiore nei casi che presentavano accumuli di polveri nel *background lung*, inoltre la percentuale di cellule tumorali positive era correlata alla quantità di antracosi riscontrata.

L'iperplasia e la displasia epiteliale osservate nel tessuto polmonare normale in contiguità con la neoplasia possono ragionevolmente essere considerate come lesioni preneoplastiche. L'evidenza di una positività all'EGFR a questo livello può quindi indicare una precoce relazione tra queste lesioni e l'evoluzione neoplastica. Tuttavia i nostri risultati non sono a favore di questa teoria, in quanto una positività per EGFR è stata osservata solo in una bassa percentuale di lesioni iperplastiche, ed esclusivamente nei casi in cui il carcinoma contiguo risultava comunque EGFR-positivo. Ciò non esclude che EGFR abbia un ruolo nella cancerogenesi polmonare, tuttavia è legittimo ipotizzare che la sovraespressione di EGFR sia un fenomeno tardivo nell'evoluzione neoplastica o che il recettore venga espresso solo nel sottogruppo di lesioni che poi effettivamente evolverà in carcinoma. Infine la positività occasionalmente riscontrata nel tessuto peritumorale può anche rappresentare una reazione al rilascio di mediatori da parte del tumore primitivo, come viene riportato in diversi studi condotti sull'uomo [Sobol *et al.*, 1987].

La sovraespressione di EGFR da parte del tessuto neoplastico è risultata associata in modo significativo a una riduzione del tempo di sopravvivenza, e mediante analisi multivariata della sopravvivenza è stato evidenziato come l'espressione di EGFR rappresenti il fattore prognostico più forte.

Il significato prognostico di EGFR nei tumori dei piccoli animali è stato precedentemente dimostrato per il carcinoma squamocellulare cutaneo del gatto [Looper *et al.*, 2006]. Nell'uomo EGFR viene utilizzato come *marker* prognostico nel carcinoma cervicofacciale [Maurizi *et al.*, 1996], genito-urinario [Mellon *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1997], ed esofageo [Inada *et al.*, 1999]. Le opinioni in merito al valore prognostico di EGFR nel NSCLC dell'uomo sono decisamente più ambigue: alcuni studi hanno riportato un tempo di sopravvivenza inferiore in caso di tumori EGFR-positivi [Tateishi *et al.*, 1990; Nicholson *et al.*, 2001; Selvaggi *et al.*, 2004], mentre altri non hanno riscontrato alcun valore prognostico [Rusch *et al.*, 1997; Fontanini *et al.*, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1996]. Questi dati contrastanti possono essere dovuti all'assenza di un metodo di analisi standardizzato per la valutazione di EGFR o per l'eterogeneità delle popolazioni prese a campione.

In questo studio, se da un lato a una bassa espressione di EGFR è stata correlata un periodo di sopravvivenza più lungo, dall'altro i soggetti che avevano un tumore completamente EGFR-negativo non avevano una prognosi significativamente migliore, quindi l'EGFR *status* non può essere di per sé considerato un fattore prognostico. Questi risultati possono in parte essere la conseguenza della difficoltà incontrata nel differenziare i tumori non immunoreattivi da quelli effettivamente EGFR-negativi, a causa della mancanza di controlli interni positivi affidabili. In alternativa è anche possibile che nei campioni negativi il segnale di trasduzione normalmente attivato da EGFR sia reso operante mediante meccanismi molecolari alternativi, quali K-ras mutato, presente esclusivamente in assenza di EGFR mutato, e viceversa. [Kraegel *et al.*, 1992; Griffey *et al.*, 1998].

Questo studio ha inoltre confermato una riduzione dei tempi di sopravvivenza nei cani con elevato stadio clinico, senza differenze significative tra stadio II e III [Ogilvie *et al.*, 1989b; McNiel *et al.*, 1992; Polton *et al.*, 2008], quindi la prognosi deve essere considerata riservata in tutti i casi in cui il tumore non è localizzato, a prescindere dal fatto che le metastasi siano ai linfonodi regionali o a distanza. Considerando separatamente i tre fattori T, N e M, il coinvolgimento dei linfonodi toracici e la presenza di metastasi a distanza si sono rivelati i fattori prognostici più attendibili, mentre le dimensioni e il grado di infiltrazione loco-regionale non hanno mostrato un significativo valore prognostico. Anche il grado istologico di malignità, messo a punto per i CPP del cane da McNiel (1997), viene ritenuto un elemento con valore prognostico; nel nostro studio tuttavia il grado istologico non è risultato correlato alla sopravvivenza, il che pone qualche dubbio sulla reale rilevanza prognostica di questo sistema di *grading*. La critica merita di essere ulteriormente approfondita con una casistica numericamente adeguata e con *follow-up* controllato. Deve essere comunque sottolineato che la scarsa attendibilità del *grading* potrebbe essere collegata all'elevato polimorfismo istologico dei CPP: nella nostra casistica in due terzi dei campioni era possibile osservare contemporaneamente due o tre istotipi differenti (carcinoma bronchioloalveolare e adenocarcinoma papillare, adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule, carcinoma adenosquamoso e carcinoma solido), con diversi gradi di differenziazione, attività mitotica e *pattern* di crescita, il che rende molto soggettiva l'attribuzione del grado istologico. Verosimilmente l'esame di più campioni per ciascun caso permetterebbe di stabilire l'istotipo realmente prevalente e quindi caratterizzare in modo più attendibile il comportamento biologico dei CPP, ma questo è possibile solo nel caso di campioni chirurgici o *post-mortem* e non nelle biopsie, e richiederebbe comunque l'allestimento, economicamente oneroso, di numerosi preparati istologici per singolo caso.

7.5 Conclusioni

Questo studio ha evidenziato un coinvolgimento delle vie di trasduzione del segnale EGFR-dipendenti nello sviluppo di CPP nel cane, rilevando una sovraespressione del recettore nel 76% dei tumori polmonari primitivi, in contrasto con la quasi totale assenza di segnale nel tessuto polmonare non neoplastico. Inoltre è stata osservata una forte relazione tra espressione di EGFR e presenza di antracosi nel *background lung*; questi dati evidenziano un potenziale coinvolgimento del recettore nel processo di cancerogenesi da inquinamento atmosferico. Infine, la percentuale di cellule neoplastiche EGFR-positive è risultata strettamente correlata a un tempo di sopravvivenza inferiore.

Sarà necessario effettuare ulteriori studi per indagare la relazione tra espressione immunohistochimica di EGFR e presenza di mutazioni attivanti, al fine di comprendere le alterazioni genetiche alla base di questa patologia. Una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari alla base della cancerogenesi e della progressione del CPP nel cane è fondamentale per prevenire lo sviluppo della malattia in modo più efficace e utilizzare nuove terapie ad azione mirata.

Bibliografia

- Auerbach O, Hammond EC, Kirman D and Garfinkel L. Effects of cigarette smoking on dogs. *Archives of Environmental Health* 1970; **21**: 754-768.
- Baselga J. New technologies in epidermal growth factor receptor targeted cancer therapy: an overview of novel therapeutic agents in development. *Signal* 2001; **1**: 12-21.
- Bettini G, Marconato L, Morini M and Ferrari F. Thyroid transcription factor-1 immunohistochemistry: diagnostic tool and malignancy marker in canine malignant lung tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 2008; **7**: 28-37.
- Bettini G, Morini M, Marconato L, Marcato PS and Zini E. Association between environmental dust exposure and lung cancer in dogs. *The Veterinary Journal* 2010; **186**: 364-369.
- Dickinson PJ, Roberts BN, Higgins RJ, Leutenegger CM, Bollen AW, Kass PH and LeCouteur RA. Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFRalpha and c-Met in canine primary brain tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; **4**: 132-140.
- Dungworth DL, Hauser B, Hahn FF, Wilson DW, Haenichen T and Harkema JR. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals - Histological Classification of Tumors of the Respiratory System of Domestic Animals*, 2nd series, vol. VI. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P and Zeillinger R. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Research* 1997; **17**: 613-619.
- Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi H, Angeletti CA, Pingitore R, Pepe S, Basolo F, Bevilacqua G. Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *European Journal of Cancer* 1995; **31A**: 178-183.
- Gama A, Gärtner F, Alves A and Schmitt F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 2009; **87**: 432-437.
- Gillett NA, Stegelmeier BL, Kelly G, Haley PJ, Hahn FF. Expression of epidermal growth factor receptor in plutonium-239-induced lung neoplasms in dogs. *Veterinary Pathology* 1992; **29**: 46-52.
- Griffey SM, Kraegel SA, Madewell BR. Rapid detection of K-ras gene mutations

- in canine lung cancer using single-strand conformational polymorphism analysis. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 959-963.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M and Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 2003; **Suppl 1**: S29-42.
- Inada S, Koto T, Futami K, Arima S and Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). *Surgery Today* 1999; **29**: 493-503.
- Kraegel SA, Gumerlock PH, Dungworth DL, Oreffo VI and Madewell BR. K-ras activation in non-small cell lung cancer in the dog. *Cancer Research* 1992; **52**: 4724-4727.
- Looper JS, Malarkey DE, Ruslander D, Proulx D and Thrall DE. Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; **4**: 33-40.
- Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G and Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 1996; **74**: 1253-1257.
- McNiell EA, Ogilvie GK, Powers BE, Hutchison JM, Salman MD and Withrow SJ. Evaluation of prognostic factors for dogs with primary lung tumors: 67 cases (1985 – 1992) . *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1997; **211**: 1422-1428.
- Mehta M, Chen LC, Gordon T, Rom W and Tang MS. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutation Research* 2008; **657**: 116-121.
- Mellon K, Wright C, Kelly P, Horne CH and Neal DE. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *The Journal of Urology* 1995; **153**: 919-925.
- Moulton J.E., Von Tscherner C. and Schneider R.. Classification of lung carcinomas in the dog and cat. *Veterinary Pathology* 1981; **18**: 513-528
- Nicholson RI, Gee JMW and Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001; **37**: S9-15.
- Nii A, Nakayama H, Takahashi R and Fujiwara K. Pathology of ten cases of canine primary lung tumor. *Nippon Jui-gaku Zasshi*. 1985; **47**: 811-815.
- Ogilvie GK, Haschek WM, Withrow SJ, Richardson RC, Harvey HJ, Henderson RA, Fowler JD, Norris AM, Tomlinson J and McCaw D. Classification of primary lung tumors in dogs: 210 cases (1975–1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1989; **195**: 106–112.
- Ogilvie GK, Weigel RM, Haschek WM, Withrow SJ, Richardson RC, Harvey HJ, Henderson RA, Fowler JD, Norris AM and Tomlinson J. Prognostic factors for tumor remission and survival in dogs after surgery for primary lung tumor: 76

- cases (1975 – 1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1989; **195**: 109–112.
- Owen LN. *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*. Geneva, World Health Organization, 1980.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M and Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 13306-13311.
- Parra HS, Cavina R, Latteri F. *Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer*. *British Journal of Cancer* 2004; **91**: 208-212.
- Pfieffer P, Clausen PP, Andersen K and Rose C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185HER-2 in patients with systemically untreated nonsmall cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *British Journal of Cancer* 1996; **74**: 86-91.
- Polton GA, Brearley MJ, Powell SM and Burton CA. Impact of primary tumour stage on survival in dogs with solitary lung tumours. *Journal of Small Animal Practice* 2008; **49**: 66–71.
- Prigent SA, Lemoine NR. *The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptor and their ligands*. *Progress in Growth Factor Research* 1992; **4**: 1-24.
- Ramos-Vara JA, Miller MA and Johnson GC. Usefulness of thyroid transcription factor-1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of primary pulmonary tumors of dogs. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 315–320.
- Reif JS and Cohen D. The environmental distribution of canine respiratory tract neoplasms. *Archives of Environmental Health* 1971; **22**: 136–140.
- Reif JS, Dunn K, Ogilvie GK and Harris CK. Passive smoking and canine lung cancer risk. *American Journal of Epidemiology* 1992; **135**: 234-239.
- Rosanda J, Bindi M, Pinelli M, Castiglioni M. Nuove strategie terapeutiche ne carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico. *Recenti Progressi in Medicina* 2008; **99**: 1-9.
- Roza MR and Viegas CA. The dog as a passive smoker: effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs. *Nicotine & Tobacco Research* 2007; **9**: 1171-1176.
- Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PWT, Langenfeld J and Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clinical Cancer Research* 1997; **3**: 515-522.
- Sabattini S, Marconato L, Zoff A, Morini M, Scarpa F, Capitani O and Bettini G. Epidermal growth factor receptor expression is predictive of poor prognosis

- in feline cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; **12**: 760-768.
- Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P and Scagliotti GV. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2004; **15**: 28-32.
- Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF and Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumors. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; **7**: 106-114.
- Smith B.J. Pleura, lungs and Mediastinum. In: *Canine anatomy*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 359-366.
- Sobol RE, Astarita RW, Hofeditz C, Masui H, Fairshter R, Royston I and Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *Journal of National Cancer Institute* 1987; **79**: 403-407.
- Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S and Sugimachi K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Research* 1990; **50**: 7077-7080.
- Weissenberg A, Sydlik U, Peuschel H, Schroeder P, Schneider M, Schins RP, Abel J and Unfried K. Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. *Free Radical Biology and Medicine* 2010; **49**: 597-605.
- Withrow SJ. Tumors of the respiratory system – Lung cancer. In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn., SJ Withrow and DM Vail eds., Philadelphia, WB Saunders Co, 2007: 517-521.

Pubblicazioni scientifiche derivate da questo studio:

“EGFR overexpression in canine primary lung cancer: pathogenetic implications and impact on survival”. **Sabattini S**, Mancini FR, Marconato L, Bacci B, Rossi F, Vignoli M, Bettini G. *Veterinary and Comparative Oncology*. Inviato per la pubblicazione.

“EGFR expression and air pollution carcinogenesis in canine primary lung tumours”. **Sabattini S**, Mancini FR, Bacci B, Rossi F, Vignoli M, Marconato L, Bettini G. *Proceedings of the 2011 Annual Congress of the European Society of Veterinary Oncology (ESVONC)*; p 20; 24-26 March 2011, Glasgow, United Kingdom.

“Espressione di EGFR e cancerogenesi da inquinamento atmosferico nei tumori polmonari del cane”. **Sabattini S**, Mancini FR, Bacci B, Rossi F, Marconato L, Bettini G. *SIONCOV/SVIDI Meeting “Neoplasie polmonari e pleuriche”*; 13-14 November 2010, Cremona, Italy.