

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET 03

FATTORI DI CRESCITA E RECETTORI TIROSIN
CHINASICI NELLE NEOPLASIE E DISPLASIE DEGLI
ANIMALI DOMESTICI

Presentata da: Dott.ssa Luisa Vera Muscatello

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Carlo Tamanini

Prof.ssa Barbara Brunetti

Esame finale anno 2016

A Federico, per essere la mia forza
A Barbara, Giancarlo ed Anna per essere stati dei grandi maestri

O me, oh vita!

Oh me, oh vita !

Domande come queste mi perseguitano,

infiniti cortei d'infedeli,

città gremite di stolti,

che vi è di nuovo in tutto questo,

oh me, oh vita !

Risposta

Che tu sei qui,

che la vita esiste e l'identità,

Che il potente spettacolo continui,

e che tu puoi contribuire con un verso.

(Walt Whitman, Foglie d'erba).

INDICE

1. Fattori di crescita e recettori cellulari nella comunicazione cellulare e nella trasduzione del segnale _____	3
2. I recettori tirosin chinasi come oncogeni _____	8
2.1. Her2 nei carcinomi mammari felini: amplificazione genica e sovrpressione proteica _____	10
2.2. Carcinomi mammarie a cellule chiare del cane _____	44
3. Fattori di crescita come promotori dell'angiogenesi tumorale _____	65
3.1. Proliferazione microvascolare glomeruloide e fattori di crescita dell'angiogenesi nei tumori dei plessi coroidei del cane _____	68
4. I fattori di crescita nella differenziazione cellulare _____	122
4.1. Condrodisplasia bovina di Ellis van Creveld _____	124

1.

FATTORI DI CRESCITA E RECETTORI CELLULARI NELLA COMUNICAZIONE CELLULARE E NELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La comunicazione cellulare è di fondamentale importanza negli organismi multicellulari. A livelli elementari, i segnali extracellulari stabiliscono se una cellula vive o muore, o se è necessario che rimanga quiescente oppure che venga stimolata a svolgere la sua specifica funzione. I segnali intercellulari sono chiaramente importanti nello sviluppo dell'embrione e nel mantenimento dell'organizzazione tissutale (Mitchell *et al.*, 2015). La perdita della comunicazione e del "controllo sociale" che mantenga la normale relazione tra le cellule può portare ad una crescita non regolata e dunque alla trasformazione neoplastica (Mitchell *et al.*, 2015). Il sequenziamento del genoma umano ha rivelato che circa il 20% dei 32.000 geni umani codificanti sono coinvolti nella trasduzione dei segnali cellulari (Blume-Jensen e Hunter, 2001). I segnali intercellulari si verificano mediante il legame di molecole segnale, i ligandi, con specifici recettori cellulari. Il legame induce una modificazione dello stato fisico del dominio intracellulare recettoriale, inducendo una cascata di eventi biochimici che portano alla trasduzione del segnale. Indipendentemente dalla natura dello stimolo, i segnali sono trasmessi alla cellula mediante specifiche proteine recettoriali (Mitchell *et al.*, 2015). I recettori cellulari sono classificati in diversi tipi sulla base dei meccanismi segnale che usano e le vie intracellulari biochimiche

che attivano (Mitchell *et al.*, 2015). I recettori con attività chinasi sono accomunati dal meccanismo di fosforilazione per mezzo del quale il segnale viene trasdotto (Mitchell *et al.*, 2015). Alterazioni della geometria recettoriale sollecitano l'attività chinasi intrinseca o promuovono l'attività enzimatica di chinasi intracellulari, risultando nell'aggiunta di gruppi fosfato su residui della tirosina (tirosin chinasi), su residui della serina e della treonina (serina treonina chinasi) o su substrati lipidici (lipide chinasi) (Mitchell *et al.*, 2015).

I recettori tirosin chinasi sono proteine integrali di membrana (**Fig. 1**); il legame con il ligando attiva un dominio tirosin chinasi intrinseco, localizzato nella loro coda citoplasmatica (Mitchell *et al.*, 2015). Nell'uomo sono noti 58 recettori tirosin chinasi, che sono categorizzati in 20 sottofamiglie (Lemmon e Schlessinger, 2010). I recettori tirosin chinasi (RTK) hanno tutti un'architettura molecolare simile, con una regione di legame per il ligando nel dominio extracellulare, una singola elica transmembrana, e una regione citoplasmatica contenente il dominio della proteina tirosina chinasi (TK) e in aggiunta regioni regolatorie carbossi-terminale supplementari (C-) e juxtamembrana (Lemmon e Schlessinger, 2010). La topologia complessiva, il meccanismo di attivazione e le componenti chiave delle vie di segnale intracellulari sono altamente conservate a livello evolutivo dal nematode *Caenorhabditis elegans* fino all'uomo (Lemmon e Schlessinger, 2010).

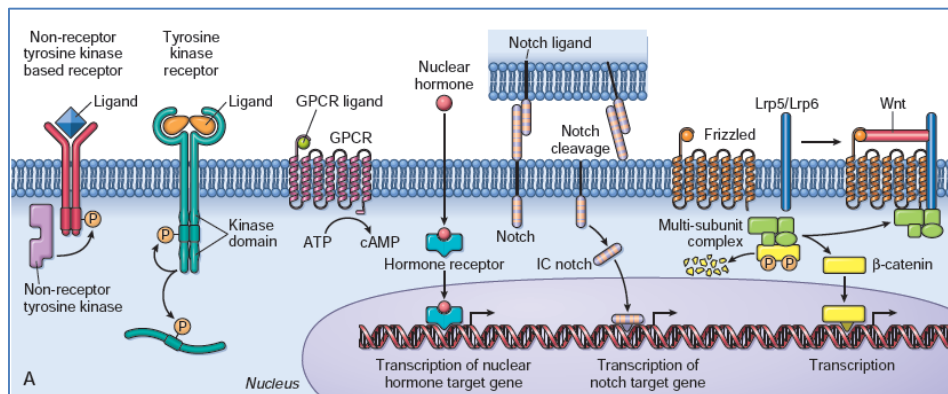


Figura 1: Categorie di recettori di segnalazione: il secondo da sinistra è il recettore tirosin chinasi, proteina integrale di membrana, con un dominio chinasi intrinseco. (Mitchell *et al.*, 2015).

Mutazioni dei RTK e l'aberrante attivazione dei loro segnali intracellulari è stata associata ai tumori, al diabete, a gravi malattie ossee, arteriosclerosi, infiammazione ed angiogenesi. Questo pone le basi per lo sviluppo di farmaci mirati a bloccare o ridurre l'attività di questi recettori (Lemmon e Schlessinger, 2010).

I recettori cellulari tirosin chinasi si legano a specifici fattori, che sono i responsabili del cambiamento conformazionale del recettore e dell'attivazione dello stato dimerico. I fattori di crescita, sono così chiamati perché in grado di stimolare l'attività di geni implicati nella crescita e divisione cellulare, ma sono inoltre coinvolti nella migrazione, differenziazione e capacità di sintesi (Mitchell *et al.*, 2015). Una proliferazione cellulare incontrollata può essere presente nel momento in cui l'attività di fattori di crescita non è regolata; molti fattori di crescita sono proto-oncogeni e mutazioni geniche degli stessi li possono convertire in oncogeni in grado di guidare la formazione tumorale (Mitchell *et al.*, 2015).

Lo scopo dello studio di dottorato è stato quello di individuare il rapporto funzionale di alcuni fattori di crescita e dei loro recettori in tipi di neoplasie e displasie degli animali domestici, quali:

- 1.** Amplificazione del proto-oncogene ERBB2 (o *HER2*) in tumori mammari della gatta e sua correlazione con la sovra-espressione del recettore tirosin chinasi erbB2.
- 2.** Espressione di erbB2, di recettori ormonali, di citocheratine luminali, basali e marcatori mioepiteliali in carcinomi mammari a cellule chiare del cane.
- 3.** Proliferazione microvascolare ed espressione di fattori di crescita dell'angiogenesi e loro recettori tirosin chinasi (PDGF, VEGF, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR1 e VEGFR2) in tumori dei plessi coroidei del cane.
- 4.** Ruolo di FGF-2 in relazione a proteine strutturali e del ciclo cellulare nella differenziazione della cartilagine di accrescimento in vitelli affetti da condrodiplosia di Ellis van Creveld e delezione del gene *EVC2*.

Bibliografia

- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):355-65.
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1117-34.
- Mitchell. The cell as unit of health and disease. In: Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.

2.

I RECETTORI TIROSIN CHINASICI COME ONCOPROTEINE

Un ampio numero di oncogeni codifica per recettori di fattori di crescita, di cui i più importanti nelle neoplasie sono i recettori tirosin chinasici (Kumar *et al.*, 2015).

I recettori tirosin chinasici, quando mutati o alterati strutturalmente, possono diventare potenti oncoproteine in grado di causare la trasformazione cellulare (Blume-Jensen e Hunter, 2001), in quanto associati ad una attività tirosin chinasica indipendente (Kumar *et al.*, 2015).

I recettori tirosin chinasici possono essere riattivati nei tumori, grazie a meccanismi multipli, quali mutazioni puntiformi, riarrangiamenti genici e amplificazioni geniche (Kumar *et al.*, 2015). Un esempio di riarrangiamento genico è quello che riguarda il recettore tirosin chinasico ALK (Chinasi del linfoma anaplastico). Nei carcinomi polmonari non a piccole cellule (NSCLC) è stato dimostrato che l'inversione all'interno del cromosoma 2p determina la fusione del gene EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) e del gene ALK (Soda *et al.*, 2007). Il prodotto della fusione risulta nella formazione di una proteina chimerica (proteina EML4-ALK), con costitutiva attività chinasica. Un altro esempio di alterazione cromosomica che può indurre la formazione di oncoproteine ad attività chinasica è quello dell'amplificazione genica. Ampiamente descritta è l'amplificazione genica di *HER2* (recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano) o ERBB2, che induce la sovraespressione proteica del recettore tirosin chinasico

erbB2, coinvolto nell'evoluzione del tumore alla mammella con comportamento prognostico infausto e nei carcinomi ovarici (Kumar *et al.*, 2015).

Bibliografia

- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):355-65.
- Kumar V, Abbas AK, Aster. Neoplasia. In: Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer, 2007, *Nature*;448(7153):561-6.

2.1.

HER2 NEI CARCINOMI MAMMARI FELINI: AMPLIFICAZIONE GENICA E SOVRESPRESSIONE PROTEICA

(Contributo sperimentale)

I recettori della famiglia EGFR sono una classe di recettori mutati e sovraespressi in vari tumori nell'uomo (Lemmon e Schlessinger, 2010).

erbB2 è un recettore transmembrana con attività chinasi. erbB2 è un recettore orfano che fallisce nel formare la struttura tetraedrica presente normalmente nella regione extracellulare degli altri recettori della famiglia EGFR (Burgess *et al.*, 2003). I tumori HER2-positivi costituiscono il 20% dei tumori al seno della donna, secondi per frequenza ai tumori che esprimono i recettori ormonali (Lester *et al.*, 2015). Nei tumori HER2-positivi, erbB2 è sovraespresso in conseguenza dell'amplificazione del gene che lo codifica (*ERBB2*, anche noto come *HER2*). L'introduzione di Trastuzumab (Herceptin), un anticorpo monoclonale umanizzato che si lega miratamente e inibisce HER2 garantisce ampi successi terapeutici in 1/3 dei pazienti con tumori HER2 positivi (Lester *et al.*, 2015). Prima di questa implementazione terapeutica, questa classe di tumori veniva considerata con un decorso clinico altamente sfavorevole e una sopravvivenza <10 anni (Lester *et al.*, 2015). L'eccezionale efficacia terapeutica di Trastuzumab, prova inoltre l'importanza di *HER2* come conduttore oncogenetico della neoplasia (Lester *et al.*, 2015).

2.1.1.Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio sperimentale è stato di valutare lo stato di amplificazione del gene HER2 in tumori mammari felini mediante metodica di ibridazione *in situ* a fluorescenza, e di valutarne la correlazione con l'espressione proteica del recettore tirosin chinasi erbB2.

2.1.2.Materiali e metodi

Collezione della casistica

In questo studio retrospettivo sono stati raccolti 110 tumori mammari, provenienti da 88 animali. I casi sono stati collezionati dall'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna. I campioni erano disponibili come materiale fissato in formalina tamponata al 10% e incluso in paraffina, con sezioni istologiche routinariamente colorate con ematossilina eosina (EE).

Segnalamento e diagnosi istologica

Ove disponibili, sono stati raccolti dati di segnalamento come razza, età, sesso e localizzazione anatomica della neoplasia. Per ogni campione è stata valutata la dimensione della neoplasia.

I tumori sono stati valutati al microscopio ottico sulla base della classificazione WHO dei tumori mammari felini (Misdorp *et al.*, 1999).

Blast

Una ricerca sul data base BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI) è stata effettuata al fine di valutare l'omologia tra la sequenza nucleotidica e il trascritto di ERBB2 tra specie felina e specie umana, considerando l'allineamento delle sequenze geniche nelle due specie (Zhang *et al.*, 2000; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Immunoistochimica (IHC)

A partire dai blocchi di paraffina della casistica esaminata, sono state tagliate al microtomo 110 sezioni, con uno spessore di 3 micron.

Le sezioni sono state sparaffinate con Solvent plus, reidratate in alcool a concentrazione decrescente, con passaggi da 3', fino al lavaggio in acqua distillata. Successivamente sono state bloccate le perossidasi endogene, con immersione dei vetrini in una soluzione di H₂O₂ al 3% in metanolo, per 30' a temperatura ambiente. Lo smascheramento dei siti antigenici è stato effettuato in tampone citrato a pH 6,0 con 2 cicli da 5' in microonde, seguito da raffreddamento a T° ambiente per 20'.

Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario anti-erbB2 (Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein, Dako, Denmark) overnight a 4°C in frigorifero. Il giorno dopo, i siti di legame con l'anticorpo primario sono stati rivelati dall'uso di un anticorpo secondario biotinilato anti-rabbit, diluito 1:200 e sono stati amplificati utilizzando un kit commerciale di avidina-biotina-perossidasi (VECTASTAIN® ABC Kits, Peterborough, UK).

La reazione è stata evidenziata con il cromogeno 3,30-diaminobenzidina (DAB) allo 0,05% per 3' a temperatura ambiente. I vetrini sono stati successivamente contro-colorati con ematossilina di Papanicolaou.

La reazione immunohistochimica è stata validata utilizzando un controllo positivo, costituito da un carcinoma mammario di gatta con positività di tipo 3+ secondo il sistema di valutazione umano (Wolff *et al.*, 2013) della Società Americana di Oncologia Clinica/College dei Patologi Americani (ASCO/CAP), e inoltre contestualmente sulla base delle linee guida standard di valutazione di HER2 nei tumori mammari del cane (Pena *et al.*, 2014). Per il controllo negativo al fine di valutare i legami aspecifici dell'anticorpo secondario è stato omesso l'anticorpo primario specifico ed è stato sostituito con un altro anticorpo primario di medesimo isotipo ma di irrilevante specificità.

L'interpretazione della reazione immunohistochimica è stata valutata con due metodi di lettura:

- 1) secondo le linee guida per il test di HER2 nel tumore al seno, emesse da ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013).
- 2) secondo il consensus di valutazione di HER2 nei tumori mammari canini (Pena *et al.*, 2014).

Le linee guida ASCO/CAP per l'immunohistochimica suddividono in 4 categorie la reattività per erbB2:

- IHC 0 (Negativo): nessuna colorazione osservata o presenza di una colorazione di membrana incompleta, debole/appena percettibile in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali.
- IHC 1+ (Negativo): colorazione di membrana incompleta, debole/appena percettibile in $> 10\%$ delle cellule tumorali.
- IHC 2+ (Equivoco): colorazione circonferenziale di membrana incompleta e/o debole/moderata in $> 10\%$ delle cellule tumorali oppure colorazione circonferenziale di membrana completa, intensa, in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali.
- IHC 3+ (Positivo): colorazione circonferenziale di membrana completa, intensa, in $> 10\%$ delle cellule tumorali.

L'algoritmo per la valutazione di HER2 secondo ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013) è riassunto in **Fig. 1**.

La valutazione deve essere effettuata con un obiettivo a piccolo ingrandimento (4x) in una popolazione di cellule invasive omogenea e contigua (Wolff *et al.*, 2013).

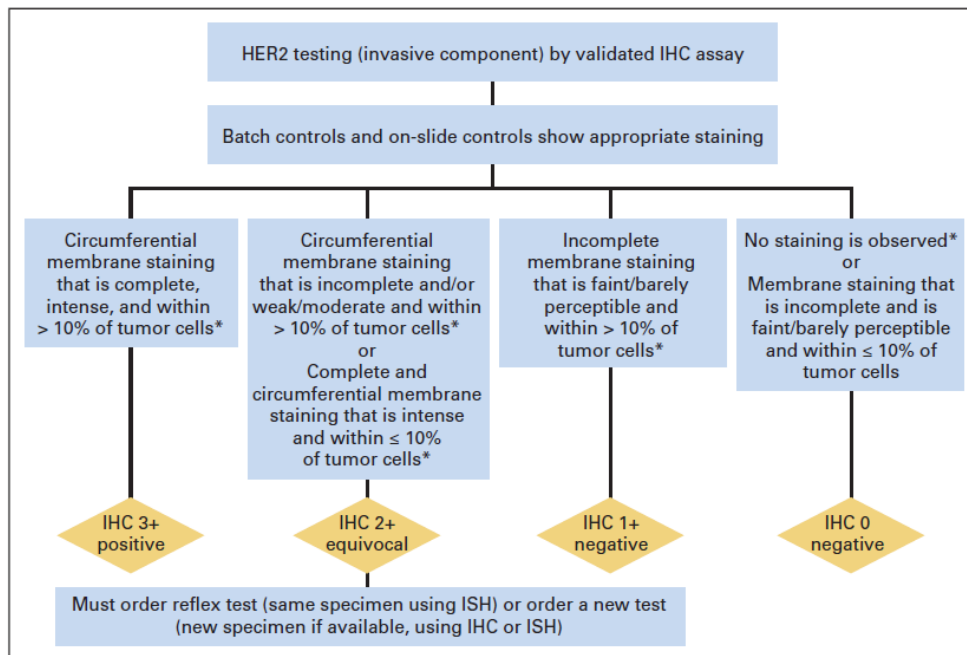


Figura 1: Algoritmo per la valutazione dell'espressione proteica di HER2 con esame immunoistochimico (Wolff *et al.*, 2013).

Le linee guida per il consensus di valutazione di HER2 nei tumori mammari canini (Pena *et al.*, 2014), basate sul precedente sistema di valutazione ASCO/CAP del 2007 (Wolff *et al.*, 2007), suddividono i tumori in 4 categorie (0, 1+, 2+, 3+) e sono considerati positivi solo i tumori con > 30% di cellule tumorali con una colorazione di membrana, intensa, uniforme e circonferenziale (chicken wire pattern), come riassunto in **Tabella 1**.

Tabella 1: Criteri di interpretazione dell'immunoistochimica di HER2 in tumori mammari canini (Pena *et al.*, 2014).

IHC Score	Criteri di interpretazione
3	Colorazione di membrane intensa, completa e omogenea in >30% delle cellule (chicken-wire pattern)
2	Colorazione di membrane intensa e completa (chicken-wire pattern) in ≤ 30% delle cellule o colorazione di membrane eterogenea completa debole o moderata in almeno il 10% delle cellule
1	Colorazione di membrana debole o incompleta in una qualsiasi percentuale di cellule
0	Colorazione assente

Tissue microarray

Sulla base dei risultati immunoistochimici 68 tumori sono stati selezionati per l'ibridazione *in situ* a fluorescenza, collezionando tutti i 3+ e i 2+, undici 1+ e uno 0. Due dei 68 tumori sono stati esaminati come sezioni intere, e 66 casi sono stati inclusi in 11 tissue microarray (TMA). Ogni TMA era costituito da 12 core, con due core per caso (TMA dual core), e un tessuto di controllo (Fig. 2).

1	3	5	
1	3	5	
2	4	6	
2	4	6	polmone

Figura 2: Schema di un TMA dual core, con un totale di 12 core e un tessuto di controllo.

In primo luogo è stata disegnata una mappa di settore, indicativa della localizzazione specifica di ogni campione in ogni TMA, utilizzata come guida sia nella costruzione e nell'assemblaggio del TMA, che nella assegnazione dei punteggi durante la valutazione (Voduc *et al.*, 2008; Muscatello *et al.*, 2015). La mappa di settore è composta da un semplice foglio di Excel, contenente l'esatta localizzazione dei casi all'interno dei TMA. Il layout del TMA è stato formulato in maniera asimmetrica e in ogni blocco è stato aggiunto un tessuto aspecifico (polmone) come core di orientamento e come controllo negativo.

La costruzione dei TMA è basata sul metodo di Kononen (1998), secondo cui un core cilindrico viene estratto da un blocco di paraffina donatore e viene inserito in un blocco di paraffina ricevente. L'estrazione dei 13 core per TMA è stata effettuata manualmente con un punch da biopsia cutanea del diametro di 3 mm. Prima dell'estrazione, l'area di interesse è stata selezionata sul vetrino di IHC, mediante osservazione al microscopio e marcatura con un pennarello. Sono stati inclusi tutti i casi positivi (3+), tutti gli equivoci (2+) e alcuni negativi (1+ e 0). I criteri di selezione dell'area, erano la presenza di tessuto neoplastico con espressione di HER2, secondo il punteggio valutato, maggiormente rappresentativo della sezione stessa, l'assenza di necrosi, infiammazione e desmoplasia. Successivamente all'estrazione dai blocchi donatori, i core di tessuto sono stati reinseriti nei cilindri vuoti previamente creati nei blocchi riceventi, e sottoposti a reinclusione.

A costruzione ultimata, di ogni TMA sono state tagliate due sezioni seriali, una colorata con EE, per revisionare la presenza/assenza del tessuto atteso, come controllo di qualità (Rimm *et al.*, 2001); l'altra per l'ibridazione *in situ* a fluorescenza.

Ibridazione *in situ* a fluorescenza

L'ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH) è stata standardizzata ed effettuata presso il laboratorio di citogenetica dell'Ospedale Bellaria di S. Lazzaro (BO), con l'aiuto e la supervisione del Dott. Enrico Di Oto e della Prof.ssa Maria Pia Foschini.

Undici sezioni di TMA, costituite da un totale di 68 casi dual core, e in aggiunta due sezioni intere sono state sottoposte ad analisi FISH. Le sezioni sono state incubate a 60°C per 10' in stufa e in aggiunta in piastra termica per 10' a 75°C. Successivamente sono state sparaffinate in xilene con 3 passaggi da 15', e reidratate in etanolo assoluto con due passaggi da 2' (Baldovini *et al.*, 2011). Le sezioni venivano lasciate asciugare e si procedeva con la selezione dell'area d'interesse con penna vetrografica. Successivamente si procedeva con il trattamento termico in tris EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) pH 9.00, a 98°C per 1h, seguito da un raffreddamento a temperatura ambiente per 20'. Le sezioni venivano poi immerse in 2xSSC (tampone sodio citrato pH7.00) per 2'.

La disidratazione delle sezioni è stata poi effettuata con passaggi da 2' in etanolo 70%, all'85% e al 100%. Le sezioni venivano fatte asciugare e

veniva applicata la sonda per ERBB2 sulla base delle istruzioni del produttore (Her2/Neu (17q12) / SE 17, Kreatech™ FISH probes). La sonda per ERBB2 è una sonda dual-color, designata nella specie umana ad identificare il gene (colore rosso) sul cromosoma 17q12 (**Fig. 3**). La regione centromerica del cromosoma è utilizzata come controllo (colore verde).

Cat.# KBI-10701 ERBB2, Her2/Neu (17q12) / SE 17

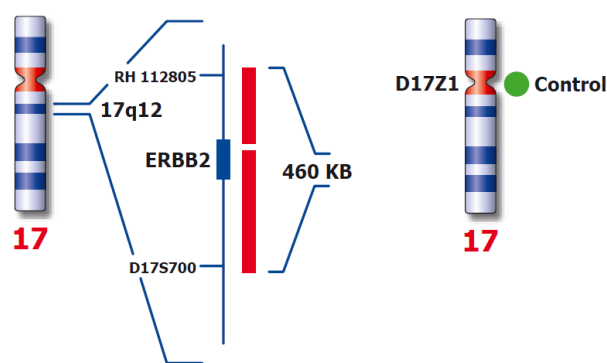


Figure 3: Sonda Kreatech™ per il gene ERBB2, localizzato nell'uomo sul cromosoma 17.

L'area di ibridazione è stata poi coperta con un vetrino coprioggetto e poi sigillata con cemento di rubber. Le sezioni sono state incubate a 75°C per 10' per effettuare la denaturazione cromosomiale e della sonda, ed overnight a 37°C per la fase di ibridazione. Il giorno successivo le sezioni sono state incubate in NP40 0.5%/2xSSC (pH 7,0–7,5) a 75°C per 2', a cui seguiva un lavaggio in 2xSSC per 2' a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi reidratate in etanolo. La contro-colorazione è stata effettuata con 4', 6'-diamidino-2-fenilindolo sospeso in antifade. Carcinomi mammari di donna amplificati per *HER2* sono stati utilizzati come controllo positivo. I core IHC 1+ e 0, e il polmone sono stati utilizzati come controlli negativi

interni al TMA. La specificità della reazione è stata inoltre valutata considerando l'euploidia di linfociti e fibroblasti adiacenti.

L'analisi delle sezioni è stata effettuata utilizzando un microscopio ad epi-fluorescenza. Un software di analisi di immagine, specifico per la citogenetica (The CytoVision®), è stato utilizzato per la valutazione del numero di copie di DNA. Sono state contate il numero di copie per ogni nucleo, in almeno 60 nuclei per ogni caso. Il sistema di analisi utilizzato per l'interpretazione delle sezioni FISH è quello basato sulle linee guida ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013). Nonostante sia stata utilizzata una sonda dual-probe (*HER2/CEP17*) dual color (rosso/verde), essendo la regione centromerica del cromosoma 17, aspecifica per il gatto, è stata effettuata una conta su matrice ISH-single probe, pertanto il segnale verde non è mai stato considerato. *ERBB2* nel gatto è invece localizzato sul cromosoma E1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/751824>). Le linee guida di ASCO/CAP categorizzano il test di ibridazione *in situ* (ISH) di *HER2* in 3 classi:

- ISH positivo: numero medio di copie di *HER2* ≥ 6 segnali per cellula.
- ISH equivoco: numero medio di copie di *HER2* ≥ 4 e < 6 segnali per cellula.
- ISH negativo: numero medio di copie di *HER2* < 4 segnali per cellula.

L'algoritmo di valutazione dell'amplificazione genica di *HER2* con ibridazione *in situ* a fluorescenza (ISH) single probe, secondo il corrente sistema ASCO/CAP è riassunto in **Fig. 4**.

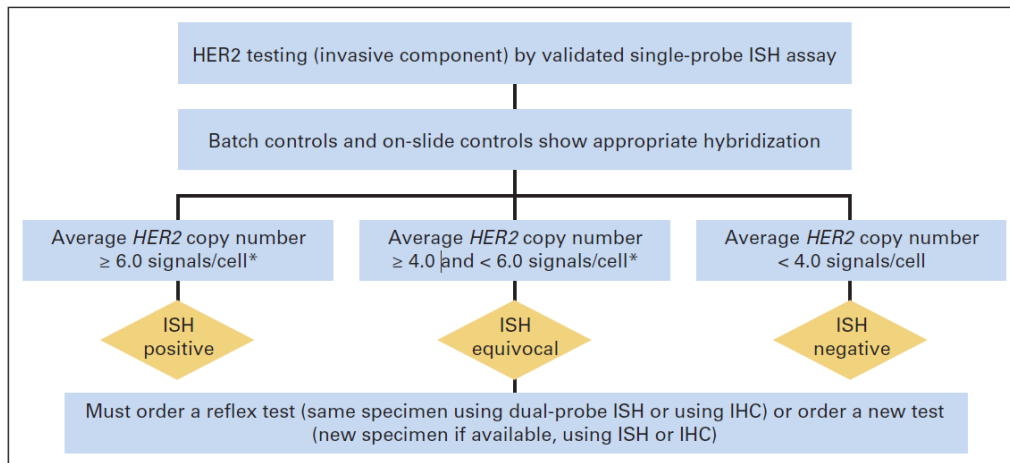


Figura 4: Algoritmo di valutazione di *HER2* con ISH single probe (Wolff *et al.*, 2013).

Se erano presenti problemi tecnici, quali artefatti o variabili pre-analitiche, che interferivano con la determinazione di uno o entrambi i test (IHC e FISH) i casi venivano classificati *HER2* indeterminati (Wolff *et al.*, 2013).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism 5. La normalità di distribuzione dei dati è stata valutata con il test D'agostino e Pearson omnibus, il test Kolmogorov-Smirnov, ed il test di Shapiro-Wilk. Per i dati di statistica descrittiva normalmente distribuiti è stato indicato il valore medio e la deviazione standard; per i dati non normalmente distribuiti è

stata indicata la mediana. I dati continui, non normalmente distribuiti, sono stati analizzati con il test di Mann–Whitney fino a 2 gruppi, e con il test di Kruskal-Wallis per più di 2 gruppi. Sui dati è stato effettuato il coefficiente di correlazione di Spearman. Un valore di $P \leq 0,05$ era considerato significativo.

2.1.3. Risultati

Segnalamento e diagnosi istologica

Di 88 animali esaminati con 110 carcinomi mammari, l'età media al momento della diagnosi era di 11,8 anni \pm 2,8 (media e deviazione standard); i dati riguardo l'età degli animali avevano distribuzione normale. La razza principalmente presente era l'Europeo; meno frequenti erano il Soriano, seguito dal Persiano, Siamese, Birmano, Certosino, Norvegese. Gli animali esaminati erano femmine intere e femmine sterilizzate. Le neoplasie erano localizzate a livello di linee mammaria destra e sinistra, con una frequenza analoga. Meno frequenti erano le neoplasie a livello di 1° mammella, seguite con progressivo aumento di frequenza a livello di 3°, 2° e 5° mammella, quest'ultima con sede più frequente. La dimensione mediana dei tumori esaminati era di 15 mm (range 3-120 mm).

Sono stati esaminati 110 carcinomi mammari, di cui la diagnosi più frequente era quella di carcinoma semplice tubulo-papillare, seguita dal carcinoma semplice solido; in minor numero in ordine di frequenza sono

stati diagnosticati il carcinoma mucoso, il carcinoma micropapillare infiltrante, il carcinoma duttale, il carcinoma cribriforme e il carcinoma squamoso.

Blast

L'allineamento ha dimostrato un omologia del 92% per i trascritti (mRNA) e un omologia del 82% per la sequenza genomica, tra gatto e uomo. Di seguito la rappresentazione grafica delle sequenze esaminate. L'allineamento viene tradotto graficamente in chiavi di colore: differenti colori hanno un significato diverso. Le barre rosse sono indicative di una sequenza equivalente; le barre rosa sono omologhe; le barre verdi, blue e nere sono indicative di un omologia più distante. Nel grafico sotto riportato erano presenti barre rosse e rosa.

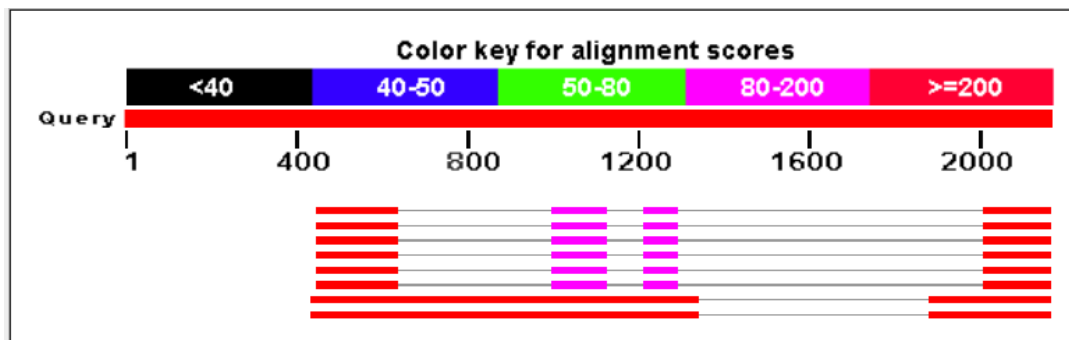


Figure 5: Distribuzione grafica di 28 Blast Hits, per la sequenza di ERBB2 richiesta.

Immunoistochimica

I due sistemi di valutazione utilizzati (Wolff *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2014) per l'assegnazione del punteggio di immunoreattività per erbB2 hanno dato dei risultati sovrapponibili in tutti i tumori mammari esaminati, con un coefficiente di correlazione elevato ($R=1$) altamente significativo ($p<0,0000000$).

I carcinomi negativi per erbB2 erano 53 su un totale di 110 casi (48%), di questi, quelli con punteggio 0 (**Fig. 6**) erano 17/110 (15%) e quelli con punteggio 1+ (**Fig. 7**) erano 36/110 (33%).

I carcinomi 2+ equivoci (**Fig. 8**) per erbB2 erano 49 su 110 (45%). I carcinomi 3+ (**Fig. 9**) positivi per erbB2 con pattern di membrana chicken-wire inequivocabile e visibile a piccolo ingrandimento erano 8 su 110 (7%).

I risultati immunoistochimici sono riassunti in **Tabella 2**. La colorazione citoplasmatica era presente, ma considerata aspecifica. L'espressione percentuale di erbB2 nei quattro gruppi di punteggio è rappresentata nel **Grafico 1**.

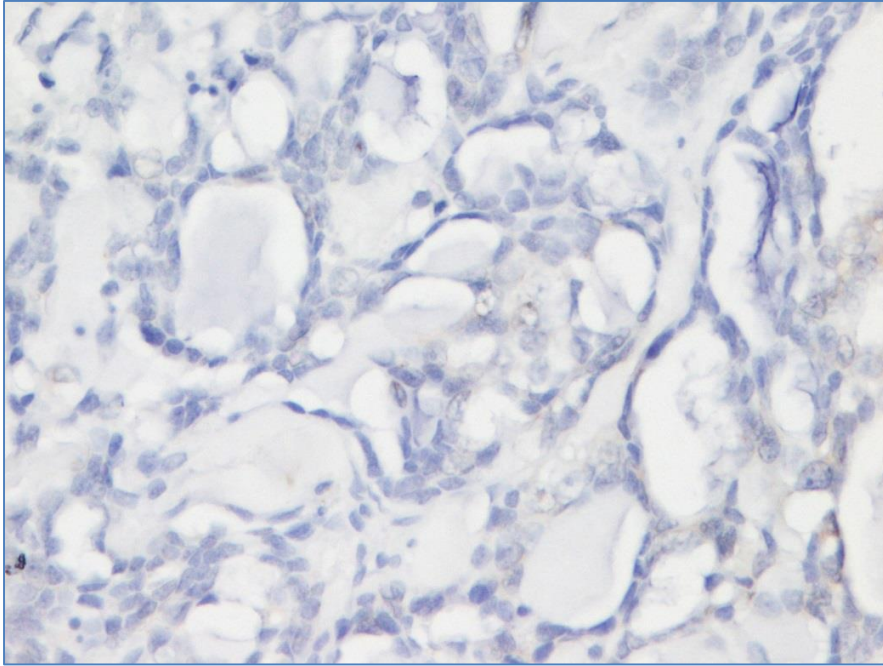


Figura 6: Carcinoma mammario con punteggio 0 per erbB2, 40x, DAB.

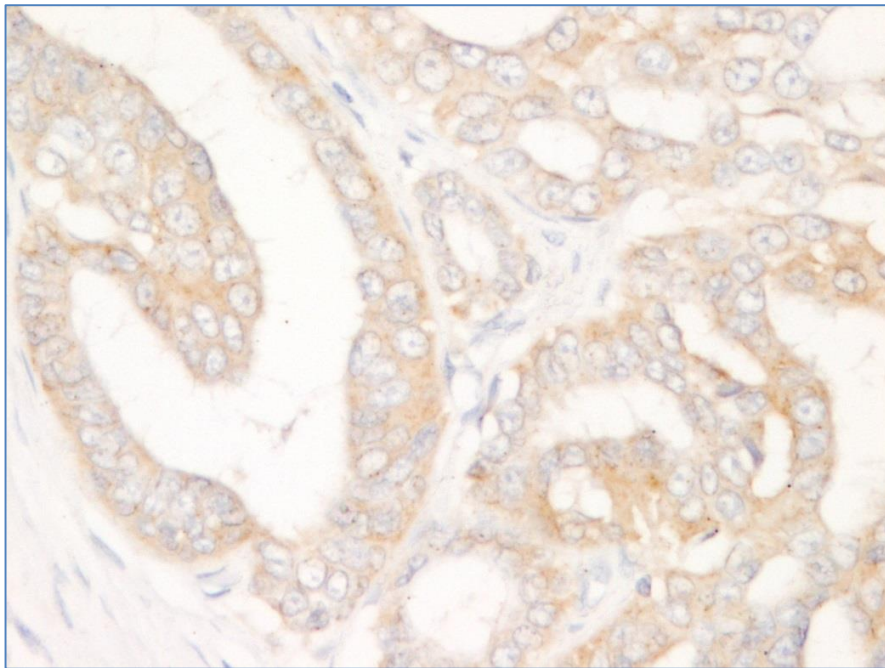


Figura 7: Carcinoma mammario con punteggio 1 per erb-B2, occasionale presenza di membrana incompleta, 40x, DAB.

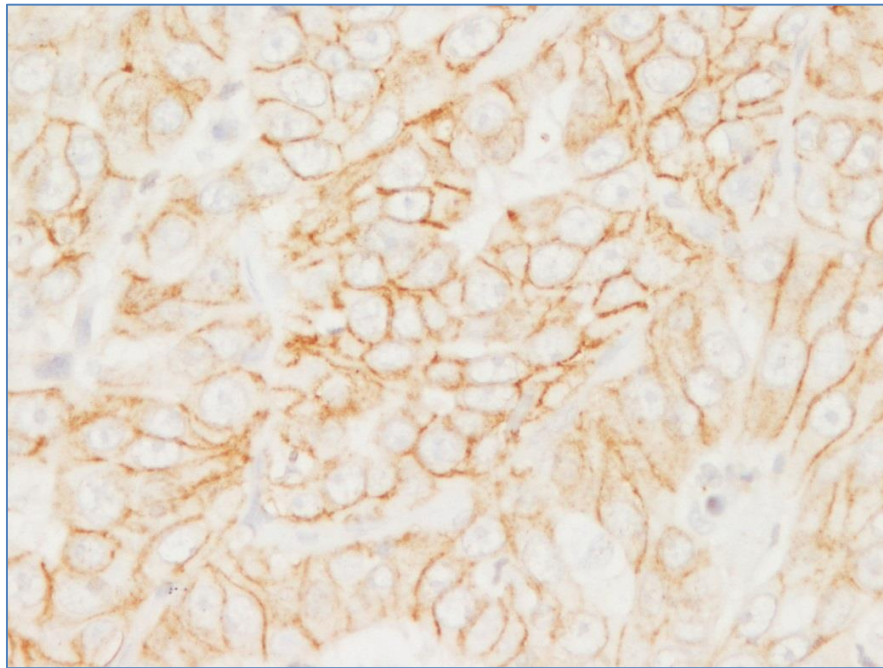


Figura 8: Carcinoma mammario con punteggio 2+, membrana completa moderatamente intensa, 40x, DAB.

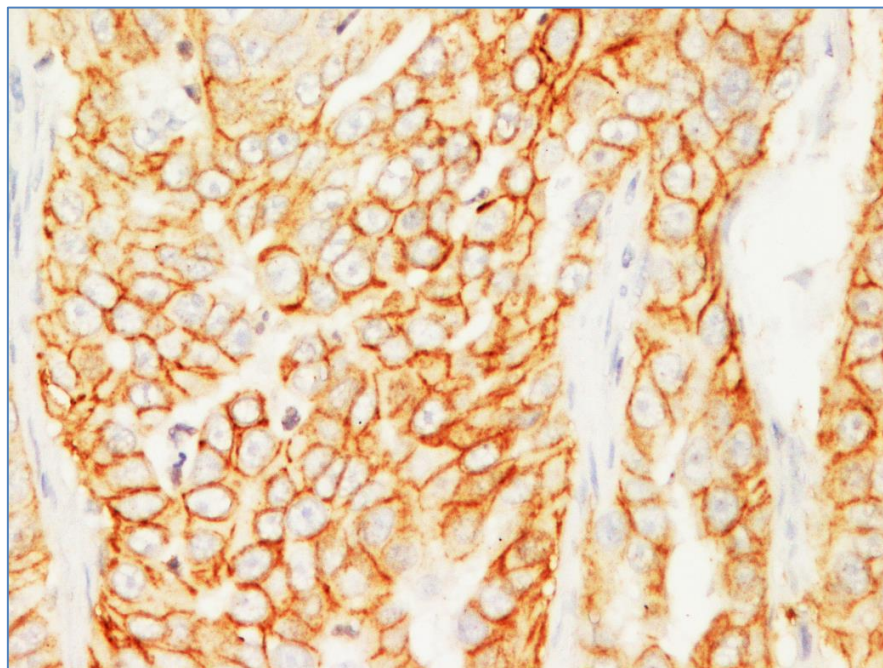


Figura 9: Carcinoma mammario con punteggio 3+, membrana completa fortemente intensa, 40x, DAB.

Tabella 2: Risultati IHC per erbB2 in 110 carcinomi felini valutati secondo Wolff *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2014.

0		1+		2+		3+	
n	%	n	%	N	%	N	%
17	15%	36	33%	49	45%	8	7%

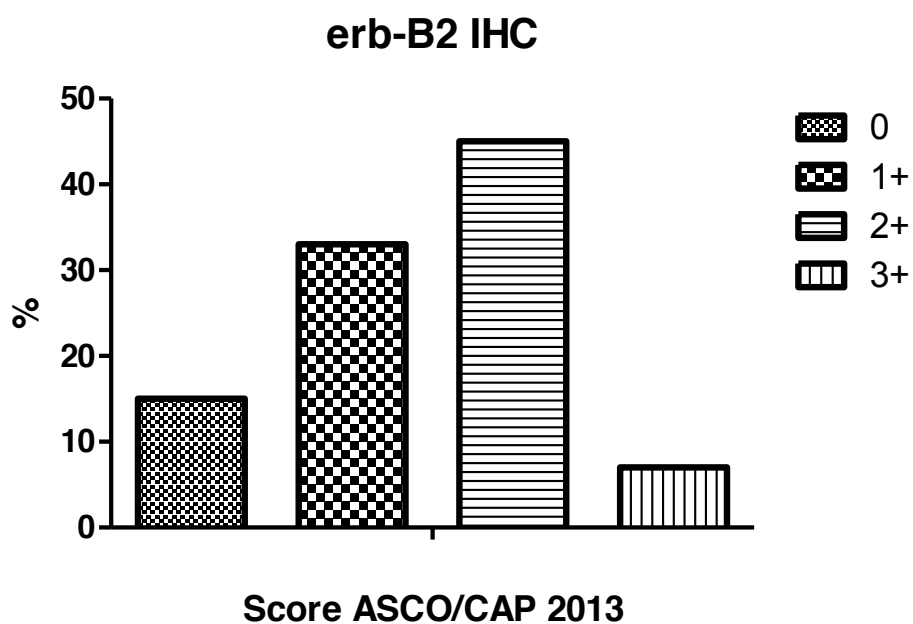


Grafico 1: Percentuale di espressione di erbB2 nei gruppo di punteggio (0, 1+, 2+, 3+) secondo ASCO/CAP 2013 nei 110 carcinomi mammari felini.

Epidemiologicamente, il gruppo di espressione più rappresentato era il gruppo degli equivoci (2+), seguito dai negativi (0,1+) ed in ultimo dai positivi (3+).

Ibridazione *in situ* a fluorescenza

Sono stati sottoposti ad analisi FISH un totale di 68 tumori di cui 66 con TMA e 2 sezione intere. I casi presi in esame erano 8 tumori erbB2 IHC positivi (3+), 48 tumori IHC equivoci (2+), 12 tumori IHC negativi, 11 con punteggio 1+ e 1 con punteggio 0.

Su 68 tumori esaminati, 6 tumori (9%) sono stati considerati *HER2* indeterminati, perché tecnicamente invalutabili. Sono risultati negativi (**Fig. 10**) per amplificazione di *HER2*, con un numero medio di copie <4, un totale di 55 casi (81%).

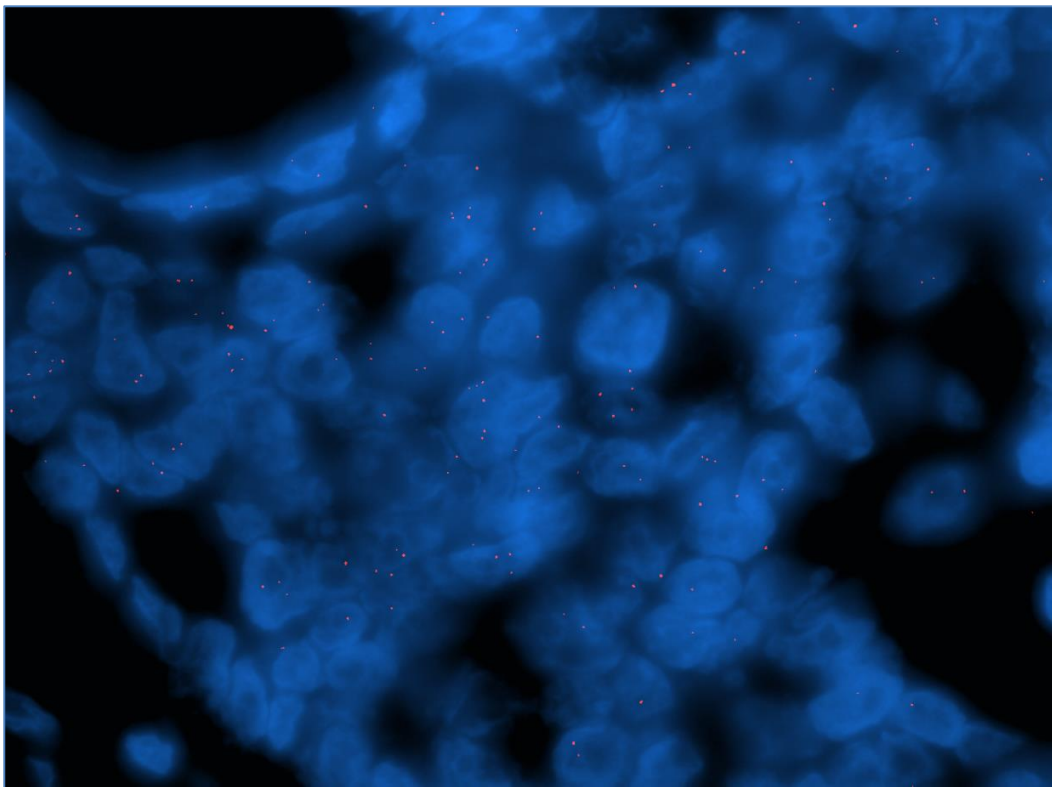


Figura 10: FISH negativo, numero di copie medio di *HER2* per nucleo pari a 2,91; in rosso ibridazione con *HER2*, 100x.

Un numero di copie medio ≥ 4 e < 6 , pertanto equivoco (**Fig. 11**) per amplificazione di *HER2*, era presente in 4/68 casi esaminati (6%). L'amplificazione di *HER2*, con un numero di copie medio > 6 , è stata riscontrata in 3/68 casi (4%). In due di essi era presente un'amplificazione a zolle (**Fig. 12**).

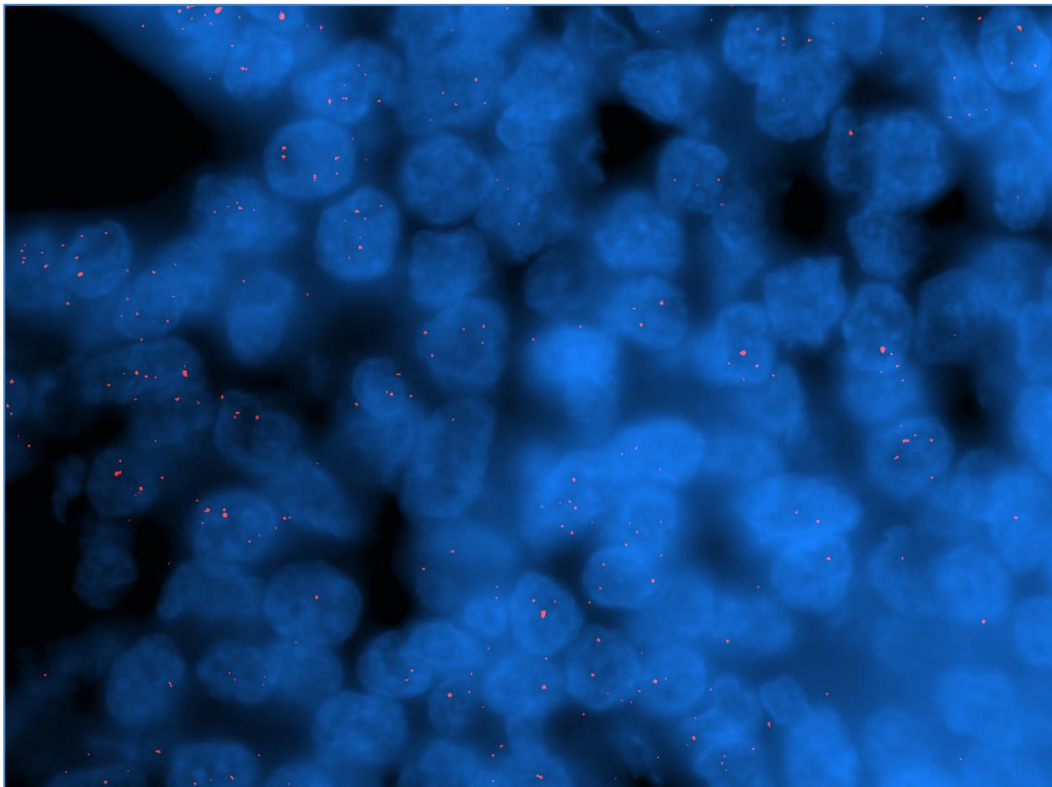


Figure 11: FISH equivoco, numero di copie medio di *HER2* per nucleo pari a 4,17, in rosso ibridazione con *HER2*, 100x.

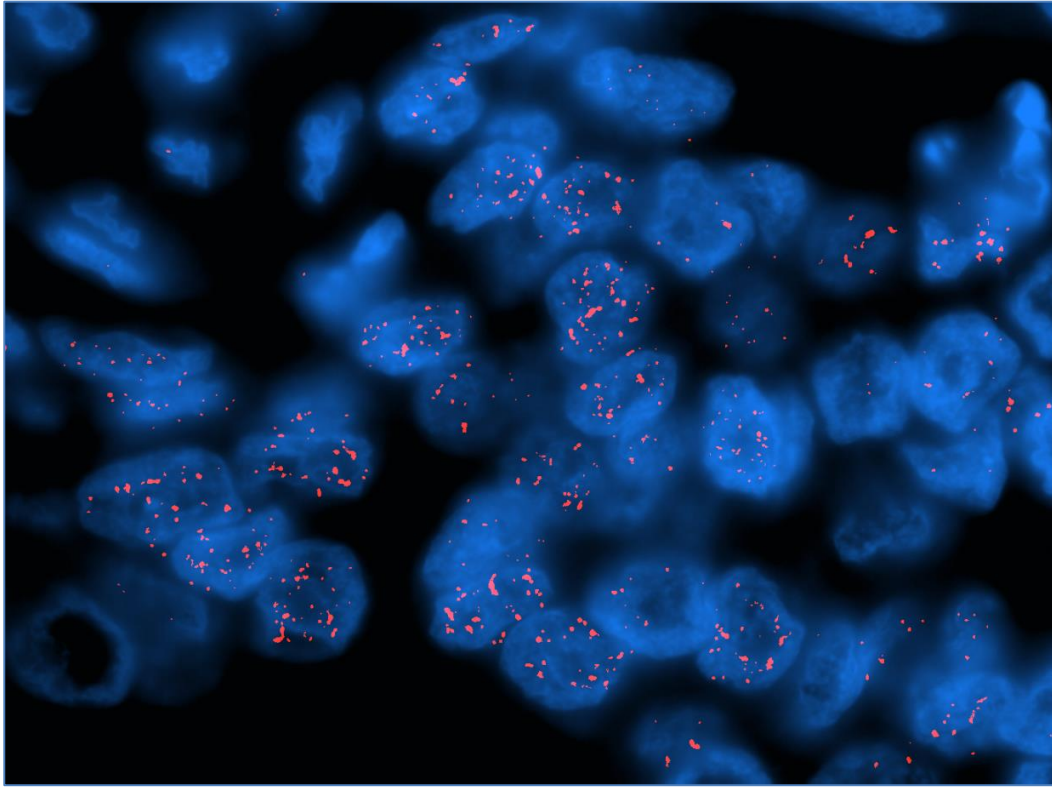


Figure 12: FISH positivo, numero medio di copie di HER2 per nucleo pari a 11,27 con amplificazione a zolle, in rosso ibridazione con *HER2*, 100x.

Tutti i casi IHC negativi (1+), 10/10, erano anche negativi per l'amplificazione di *HER2*, con un numero di copie <4 (**Grafico 2**).

La maggior parte dei casi equivoci (2+) per l'espressione di erbB2 all'IHC, 41/44 (93%), non erano amplificati, con un numero di copie <4; due su 44 casi (5%) con espressione proteica equivoca, avevano un numero di copie ≥ 4 e <6 e pertanto con amplificazione di *HER2* equivoca; un caso su 44 (2%) con espressione proteica equivoca, aveva un numero di copie >6, e presentava un amplificazione di *HER2* a zolle (**Grafico 3**).

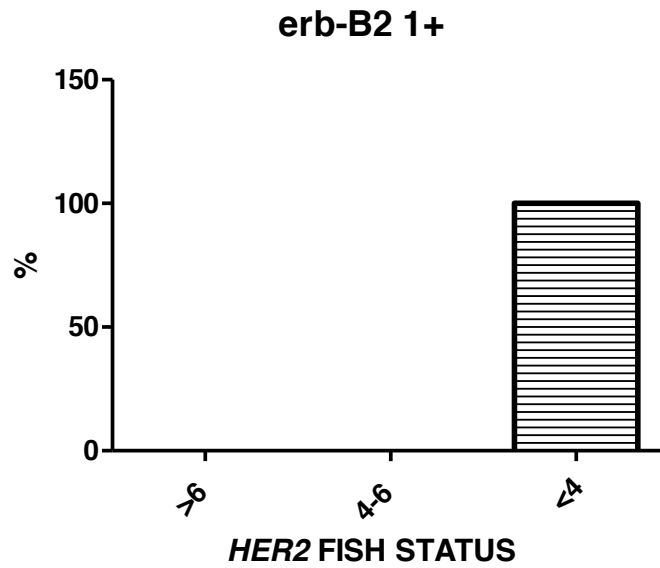


Grafico 2: Stato di amplificazione di *HER2* in casi negativi (1+) per l'espressione di erbB2 all'IHC; tutti i casi negativi non mostrano amplificazione genica (numero di copie <4).

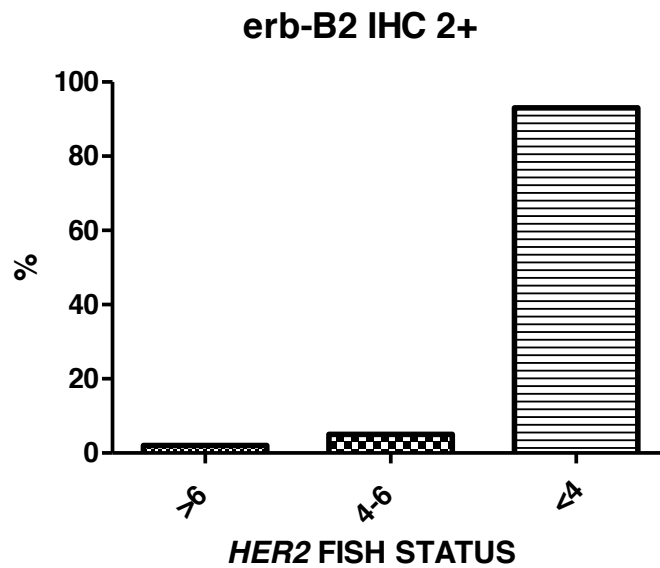


Grafico 3: Stato di amplificazione di *HER2* in casi equivoci (2+) per l'espressione di erbB2 all'IHC; il 93% non presenta amplificazione (<4 copie), il 5% presenta amplificazione equivoca (≥ 4 e <6) e il 2% amplificazione a zolle (>6 copie).

I carcinomi positivi (3+) per l'espressione di erbB2 all'IHC avevano un numero di copie >6 in 2 di 8 casi (25%) e pertanto presentavano un'amplificazione genica di *HER2*; un'amplificazione equivoca, con un numero di copie ≥ 4 e <6 era presente in 2 di 8 casi (25%) con sovraespressione proteica di erbB2 (3+). Quattro di 8 casi (50%) erbB2 positivi (3+), inoltre, presentavano un numero di copie <4, e dunque con assenza di amplificazione genica (**Grafico 4**).

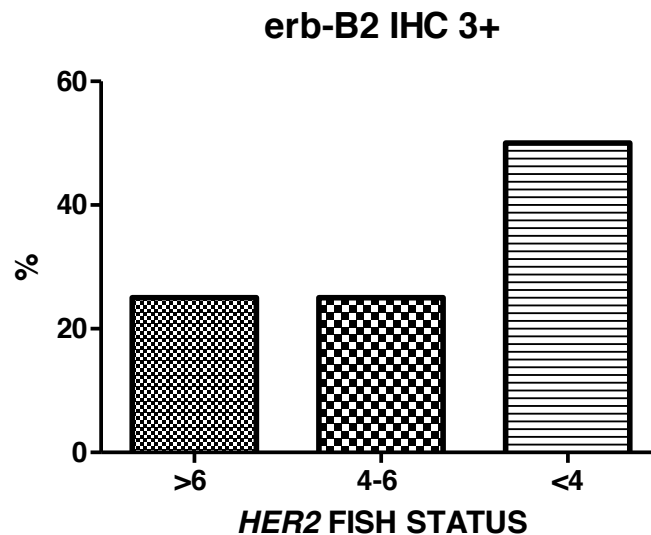


Grafico 4: Stato di amplificazione di *HER2* in casi positivi (3+) per l'espressione di erbB2 all'IHC; il 25% presentava amplificazione genica (>6 copie), il 25% presentava amplificazione equivoca (≥ 4 e <6) ed il 50% non presenta amplificazione (<4 copie).

Il coefficiente di regressione lineare tra lo stato di amplificazione ed espressione proteica nei casi esaminati era di $R=0,325$ ($p=0,001$). Il coefficiente di regressione lineare aumentava se veniva escluso il gruppo

con correlazione maggiormente variabile, cioè il gruppo degli equivoci (R=0,5387; p=0,021).

I risultati della comparazione tra stato di amplificazione di *HER2* (positivo, equivoco e negativo) e espressione proteica di *erbB2* (positivo, equivoco, negativo) sono riassunti in **Tabella 3**.

Tabella 3: Risultati della comparazione tra stato di amplificazione di *HER2* (FISH positivo, equivoco e negativo) ed espressione proteica di *erbB2* (IHC positivo, equivoco, negativo).

	IHC 3+		IHC 2+		IHC 1+	
	n	%	n	%	n	%
FISH positivo >6	2	25%	1	2%	0	0%
FISH equivoco 4-6	2	25%	2	5%	0	0%
FISH negativo <4	4	50%	41	93%	10	100%
Totale	8		44		10	

Considerando i tre gruppi di espressione proteica di *erbB2* (3+, 2+ e 1+) e comparando il numero di copie con analisi FISH negli stessi gruppi, i valori mediani e i range del numero di copie per gruppo erano i seguenti:

- gruppo con IHC 1+: mediana 2,389 e range 2,171 - 3,4,
- gruppo con IHC 2+: mediana 2,711 e range 2,321– 11,27
- gruppo con IHC 3+: mediana 3,564 e range 2,533 – 7,692.

Lo stato di amplificazione di *HER2* nei tre gruppi (3+, 2+, 1+) di espressione proteica *erbB2* è rappresentato nel **Grafico 5**.

HER2 amplification status

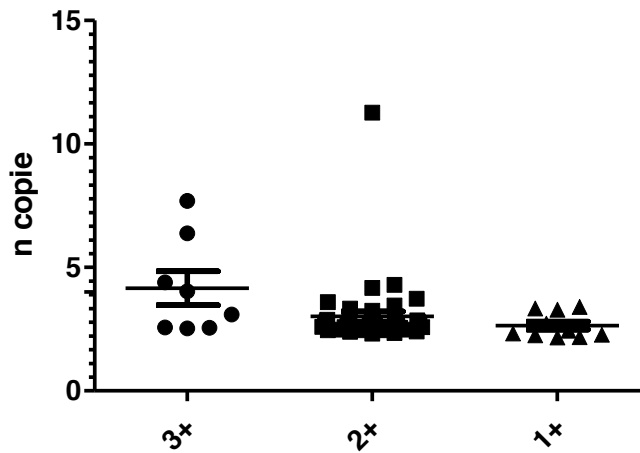


Grafico 5: Stato di amplificazione di HER2 nei tre gruppi (3+, 2+, 1+) di espressione proteica erbB2;

2.1.4. Discussione

L'ortologo felino del gene HER2 umano è stato sequenziato nel 2005 con un'omologia del dominio chinasi del 92% (De Maria *et al.*, 2005). Contestualmente, nello stesso studio è stato riscontrato un aumento dell'mRNA su colture cellulari e carcinomi felini, ma senza un'associazione con l'amplificazione genica (De Maria *et al.*, 2005). Il livello di espressione proteica è stato successivamente studiato nei carcinomi mammari della gatta, con riscontro di livelli di espressione variabili a seconda delle metodiche e del sistema di valutazione utilizzato (De Maria *et al.*, 2005; Burrai *et al.*, 2010; Rasotto *et al.*, 2011; Brunetti *et al.*, 2013; Maniscalco *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Recentemente sono state proposte delle linee guida standard per la valutazione immunohistochimica dei marcatori

epiteliali e mioepiteliali, di HER2 e dei recettori ormonali dei carcinomi mammari del cane (Peña *et al.*, 2014). Queste, linee guida per la valutazione di HER2, suggeriscono di considerare come positivi i campioni che hanno un pattern di membrana completa e intensa di tipo “chicken wire” in una percentuale di cellule neoplastiche >30% (Peña *et al.*, 2014). Le più recenti linee guida fornite da ASCO/CAP per i carcinomi al seno della donna forniscono un algoritmo di valutazione che sotto-classifica i tumori in classi di espressione proteica negativi (0,1+), equivoci (2+) e positivi (3+) con un cut-off di espressione del 10% (Wolff *et al.*, 2013). Secondo queste linee guida i tumori equivoci (2+) all'immunohistochimica sono routinariamente sottoposti ad esame di ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH) per valutare il reale grado di amplificazione genica (Wolff *et al.*, 2013). Pertanto la FISH è considerata il sistema golden standard di riscontro dell'amplificazione di HER2, e di essa sono raccomandate le linee guida di valutazione (Wolff *et al.*, 2013). Nel presente studio sperimentale abbiamo effettuato l'immunohistochimica di erbB2 su 110 carcinomi felini effettuando la valutazione sia con il sistema suggerito nel cane (Peña *et al.*, 2014), che con quello indicato da ASCO/CAP per i tumori al seno (Wolff *et al.*, 2013). I due sistemi di valutazione hanno riportato risultati sovrapponibili, con un coefficiente di regressione lineare pari a $R=1$ ($p<0,0000000$). Inoltre i casi positivi, equivoci e alcuni casi negativi sono stati sottoposti ad esame FISH al fine di valutare lo stato di amplificazione di *HER2*. È stata riscontrata la presenza di amplificazione di *HER2* nel 25% dei casi erbB2 positivi (3+).

Una parte dei casi (25%) erbB2 positivi è risultata equivoca per *HER2* (con un numero medio di copie per nucleo ≥ 4 e <6); nella donna secondo la diagnostica di routine, in questo gruppo di amplificazione viene riefettuato il campionamento in vista dell'eterogeneità d'espressione di *HER2* nei tumori mammari (Wolff *et al.*, 2013), ma i pazienti sono comunque ritenuti eleggibili per la terapia. Inoltre, un gruppo di tumori con espressione proteica 3+ è risultato con assente amplificazione di *HER2* (50%). Nell'uomo l'indice di concordanza tra amplificazione genica con analisi FISH e la sovraespressione proteica con IHC è pari all'80% dei tumori (Ross *et al.*, 2009), sebbene differenti studi riportino una maggiore concordanza nei tumori 0 e 1+ (negativi), rispetto ad un incremento di discordanza tra FISH e IHC nei tumori 2+ e 3+ (Dendukuri *et al.*, 2007). La presenza di discordanza nei nostri casi con IHC 3+ non amplificati alla FISH, è da ricondurre ad un possibile eccesso della proteina erbB2 in assenza di amplificazione genica, giustificabile con un meccanismo di alterazione post-trasduzionale di non degradazione del recettore. Un'altra ipotesi potrebbe essere basata sulla presenza di problemi tecnici di tipo pre-analitico come la durata di fissazione del campione. Secondo ASCO/CAP la fissazione del campione non dovrebbe superare le 72h (Wolff *et al.*, 2013), variabile difficile da controllare nei nostri campioni di diagnostica collezionati.

Nell'uomo è stato dimostrato che la conferma dello stato di *HER2* mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza nei casi con score IHC 3+, annulla la percentuale di falsi positivi e incrementa l'accuratezza dello stato di *HER2*

nei casi equivoci riducendo inoltre il numero di falsi negativi (Dendukuri *et al.*, 2007), come nella nostra casistica dove era presente un 2% di casi equivoci per IHC ma amplificati alla FISH e un 5% con amplificazione equivoca.

Soares *et al.*, (2013), indagano lo stato di *HER2* in tumori mammari felini con erbB2 sovraespresso mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH), cromogenica (CISH) e silver (SISH), ma nel loro studio nessuna amplificazione è stata riscontrata (Soares *et al.*, 2013). In un altro studio, lo stato di amplificazione di *HER2* mediante CISH è stata valuta in 30 carcinomi mammari felini ed è stata identificata nel 16% dei casi (Ordas *et al.*, 2007). Nel nostro studio sono stati sottoposti ad esame FISH 68 tumori, e nel 25% dei campioni con punteggio immunohistochimico 3+ è stata trovata amplificazione genica di *HER2*; inoltre il 25% dei campioni con punteggio immunohistochimico 3+ avevano amplificazione genica equivoca. L'amplificazione di *HER2* è stata identificata con la metodica (FISH) e con le linee guida standard proposte da ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013). L'identificazione dello stato di amplificazione di *HER2* nella gatta pone le basi per una terapia specifica di supporto alla sola terapia chirurgica correntemente utilizzata nella specie felina.

Un approccio terapeutico mirato in particolare per il tumore al seno *HER2* positivo, ha condotto alla formulazione di un vasto range di terapie dirette contro l'oncoproteina p185 *HER2* (Nanni *et al.*, 2013). Trastuzumab, il primo anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro *HER2*, si lega al

subdominio IV del dominio extracellulare di HER2 ed esercita il suo effetto antitumorale bloccando il clivaggio di HER2, stimolando un'immunotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, e inibendone l'attività mitogenica (Molina *et al.*, 2001; Scheuer *et al.*, 2009; Junttila *et al.*, 2009). Trastuzumab in combinazione con pertuzumab, un anticorpo monoclonale che si lega su un epitopo differente rispetto a quello di trastuzumab, aumenta la sopravvivenza complessiva di pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico *HER2* positivo (Baselga *et al.*, 2012). L'utilizzo di un inibitore tirosin chinasi, il lapatinib, che agisce sull'attività chinasi di HER2, in associazione con trastuzumab, è associato ad una maggiore sopravvivenza nel trattamento del tumore al seno in uno stadio precoce (de Azambuja *et al.*, 2014).

La prevenzione del cancro viene convenzionalmente suddivisa in primaria, secondaria e terziaria (Lollini *et al.*, 2015). La prevenzione primaria, che per definizione consta nella riduzione del rischio della malattia, è convenzionalmente considerata come una ridotta esposizione agli agenti cancerogeni (Dos Santos Silva *et al.*, 1999). Di recente è stata introdotta la viroterapia oncolitica che consta nell'utilizzo di vettori virali in grado di veicolare un vaccino tumorale diretto verso molecole target e somministrato preventivamente dello sviluppo della neoplasia, in fase di prevenzione primaria (Lollini *et al.*, 2015). Un herpesvirus oncolitico ingegnerizzato per mirare le cellule tumorali esprimenti HER2 somministrato pre-clinicamente, ossia prima dell'impianto intraperitoneale di carcinoma ovarico umano e

carcinoma mammario esprimenti HER2 in topi immunodeficienti, consente di proteggere dalla carcinomatosi peritoneale e dalla crescita metastatica del carcinoma mammario (Nanni *et al.*, 2013). L'immunoprevenzione tumorale e nello specifico del carcinoma mammario, è basata su una risposta immunomediata di tipo citotossico, con rilascio di interferone γ da parte dei linfociti T-helper (Lollini *et al.*, 2010).

La variabilità terapeutica adottata nel trattamento del tumore al seno della donna, complica l'interpretazione dei dati riguardo la risposta alla terapia e il puro valore predittivo degli stessi, pertanto il riscontro nel gatto dello stato di amplificazione di *HER2* associato ad una sovraespressione proteica della proteina erbB2 lo rende eleggibile come modello spontaneo traslazionale in assenza di somministrazione terapeutica. In ultimo, la presenza di amplificazione genica e di sovraespressione proteica nei tumori mammari della gatta, pone le basi per una proposta di formulazione di farmaci specifici per la specie felina.

2.1.5. Conclusione

Il gene *HER2* nella gatta risulta amplificato e la proteina erbB2 è sovraespressa, in un sottoinsieme di carcinomi mammari. L'ibridazione *in situ* a fluorescenza è un metodo ottimale per l'identificazione dell'amplificazione genica e l'individuazione di falsi negativi e falsi positivi ottenuti con l'immunoistochimica.

2.1.6. Bibliografia

- Baldovini C, Tosi AL, Di Oto E *et al.* Genetic markers of oral malignant melanoma analysed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). *Virchows Arch.* 2011 Aug;459(2):167-73.
- Baselga J, Cortés J, Kim SB *et al.* Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jan 12;366(2):109-19.
- Brunetti B, Asproni P, Beha G, Muscatello LV, Millanta F, Poli A, Benazzi C, Sarli G. Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *J Comp Pathol.* 2013 Feb;148(2-3):206-13.
- Burrari GP, Mohammed SI, Miller MA *et al.* Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer.* 2010 Apr 22;10:156.
- de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):1137-46.
- 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 Res.* 2005 Feb 1;65(3):907-12.

- Dos Santos Silva I. *Cancer Epidemiology: Principles and Method*. IARC Publications; Lyon, France: 1999.
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, *et al.* Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 2009;15:429-40.
- Kononen J. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, 1998, 4, 844-847.
- Lester S. The breast. In: *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, De Giovanni C, Nanni P. Immunoprevention and immunotherapy of mammary carcinoma. *Breast J.* 2010 Sep-Oct;16 Suppl 1:S39-41.
- Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Quagliano E. The Promise of Preventive Cancer Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015 Jun 17;3(2):467-89.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP (1999) *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Centre for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC, pp. 12-13, 25-27.
- Maniscalco L, Millán Y, Iussich S *et al.* Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in triple negative feline mammary carcinomas. *BMC Vet Res.* 2013 Apr 15;9:80.

- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell *et al.* Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:4744-9.
- Muscatello LV, Sarli G, Beha G *et al.* Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. *J Comp Pathol.* 2015 Feb-Apr;152(2-3):153-60.
- Nanni P, Gatta V, Menotti L *et al.* Preclinical therapy of disseminated HER-2⁺ ovarian and breast carcinomas with a HER-2-retargeted oncolytic herpesvirus. *PLoS Pathog.* 2013 Jan;9(1):e1003155.
- Ordás J, Millán Y, Dios R, Reymundo C, de Las Mulas JM. Proto-oncogene HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization study. *BMC Cancer.* 2007 Sep 20;7:179.
- Peña L, Gama A, Goldschmidt MH *et al.* Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2014 Jan;51(1):127-45.
- Rasotto R, Caliarì D, Castagnaro M, Zanetti R, Zappulli V. An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *J Comp Pathol.* 2011 Feb-Apr;144(2-3):170-9.

- Rimm DL, Camp RL, Charette *et al.* Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Experimental Molecular Pathology*, 2001, 70, 255-264.
- Santos S, Baptista CS, Abreu RM *et al.* ERBB2 in cat mammary neoplasias disclosed a positive correlation between RNA and protein low expression levels: a model for erbB-2 negative human breast cancer. *PLoS One*. 2013 Dec 26;8(12):e83673.
- Scheuer W, Friess T, Burtscher H *et al.* Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 2009;69:9330-6.
- Voduc D, Kenney C, Nielsen TO (2008) Tissue microarrays in clinical oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, 18, 89-97.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007, 25:118-145.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, and Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

2.2.

CARCINOMI MAMMARI A CELLULE CHIARE DEL CANE

(Contributo sperimentale)

I carcinomi mammari a cellule chiare sono descritti nella donna, come tumori caratterizzati da cellule neoplastiche con citoplasma chiaro otticamente vuoto (Hull *et al.*, 1989). Nella specie umana le principali diagnosi differenziali da considerare in questo gruppo eterogeneo di tumori sono il carcinoma lipid rich, il carcinoma glycogen-rich, il carcinoma apocrino e il carcinoma secretorio (Rosen *et al.*, 2001). In letteratura veterinaria, in accordo con la classificazione WHO (Misdorp *et al.*, 1999) e la più recente classificazione (Goldschmidt *et al.*, 2011) dei tumori mammari del cane, è considerato un solo tipo di carcinoma mammario a cellule chiare: il carcinoma lipid rich. Un caso di carcinoma secretorio è stato riportato in un Pastore Tedesco di 3 anni (Cassali *et al.*, 1999), ma sono poche le informazioni riguardo questo tipo istologico. Il carcinoma glycogen-rich è un raro sottotipo di carcinoma mammario con un'incidenza del 3% dei tumori al seno della donna, in cui almeno il 90% delle cellule neoplastiche hanno un citoplasma chiaro contenente glicogeno (Tavassoli *et al.*, 2003). Il carcinoma glycogen-rich nella donna è considerato un tipo istologico aggressivo, con una elevata incidenza di metastasi al linfonodo ascellare, un elevato grado istologico ed una sopravvivenza breve (Tavassoli *et al.*, 2003). Il carcinoma glycogen-rich condivide le caratteristiche morfologiche descritte per il carcinoma a cellule chiare di polmone, endometrio, cervice, ovaio, rene e ghiandole salivari (Rosen *et al.*,

2001). Le diverse caratteristiche istologiche del tumore mammario sono considerate le manifestazioni esterne visibili di complesse alterazioni genetiche ed epigenetiche, che guidano la carcinogenesi (Lester *et al.*, 2015). A tale scopo un approccio che vada ad investigare i meccanismi molecolari è fondamentale per l'individuazione ontogenica della malattia. I carcinomi mammari su base molecolare sono suddivisi in:

- Tumori ER-positivi ed HER2-negativi, anche noti come "Luminal".
- Tumori HER2-positivi, anche noti come "HER2-enriched"
- Tumori ER-negativi ed HER2-positivi, anche noti come "Basal-like" o "Triple negative".

2.2.1 Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato di valutare l'espressione di erbB2, di recettori ormonali, di citocheratine luminali, basali e marcatori mioepiteliali in carcinomi mammari a cellule chiare del cane e di formulare un algoritmo con colorazioni di istochimica e immunoistochimica in grado di investigare le componenti chimiche delle cellule neoplastiche, con supporto dei dati morfologici ed ultrastrutturali.

2.2.2 Materiali e Metodi

Casistica

Sono stati collezionati retrospettivamente 9 casi con diagnosi morfologica di carcinoma mammario lipid-rich nel cane, dagli archivi dei Servizi di

Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, del Dipartimento di Patologia Animale Profilassi Igiene degli Alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa e del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università di Milano.

I campioni erano disponibili come materiale fissato in formalina tamponata e incluso in paraffina, con sezioni colorate con Ematossilina-Eosina.

Diagnosi Istologica, stadio e grado Istologico

I campioni sono stati analizzati singolarmente al microscopio ottico al fine di definirne il tipo istologico in accordo al sistema classificativo WHO (Misdorp *et al.*, 1999) e secondo il sistema di Goldschmidt *et al.*, (2011), e di confermare l'effettiva presenza di metastasi a livello linfonodale. Il sistema di stadiazione istologica adottato per valutare l'invasività è quello di Gilbertson *et al.* (1983).

Il sistema di Gilbertson *et al.* (1989) consente la distinzione di quattro gruppi:

- Stadio istologico 0: tumore maligno non infiltrante, in cui la proliferazione neoplastica non supera la membrana basale.
- Stadio istologico 1: tumore maligno infiltrante con superamento della membrana basale e invasione stromale.

- Stadio istologico 2: tumore maligno infiltrante con emboli nei vasi linfatici o ematici e/o metastasi al linfonodo regionale (inguinale superficiale o ascellare ipsilaterale).
- Stadio istologico 3: tumore maligno infiltrante con metastasi extra-linfonodali.

Il grado istologico è stato calcolato secondo Peña *et al.*, 2013. Il grado è basato sulla valutazione morfologica di tre criteri istologici di malignità, quali:

- la formazione tubulare,
- il pleomorfismo nucleare
- il numero di mitosi in 10 campi a forte ingrandimento.

Secondo questo sistema di grading, ad ognuno dei tre parametri viene assegnato un punteggio da 1 a 3. I criteri per la formulazione del grado istologico sono riassunti in **Tabella 1**.

Tabella 1. Grado istologico dei tumori mammari canini (Peña *et al.*, 2013).

	Punti	
Formazione tubulare	1	formazione tubulare >75%
	2	formazione tubulare 10-75%
	3	formazione tubulare <10%
Pleomorfismo nucleare	1	nuclei uniformi e regolari e nucleoli occasionalmente evidenti
	2	moderata variazione nella forma e nella dimensione nucleare, con nuclei ipercromatici e nucleoli occasionalmente prominenti
	3	marcata variazione nella forma e nella dimensione nucleare, con nuclei ipercromatici e presenza di ≥ 1 nucleoli per nucleo
Mitosi in 10 HPF	1	0–9 mitosi/10 HPF
	2	10–19 mitoses/10 HPF
	3	20 mitoses/10 HPF
Punteggio totale	3 - 5	Grado I (basso);
	6 - 7	Grado II (intermedio)
	8 - 9	Grado III (alto)

Immunoistochimica

Per ogni campione di materiale incluso in paraffina sono state effettuate 7 sezioni seriali dello spessore di 3 μm . Il pannello di anticorpi testati è il seguente: anti-recettore degli Estrogeni (ER), -recettore del progesterone (PR), -anti-recettore 2 del fattore di crescita epidermico (erbB2), -citocheratina 5/6 (CK 5/6), -citocheratina 14 (CK 14), -citocheratina 19 (CK 19), -p63, vimentina, calponina. Le sezioni, sono state sparaffinate con Solvent Plus e reidratate in alcool a concentrazione decrescente. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata effettuata con H_2O_2 al 3% in metanolo per 30 minuti a T° ambiente. Lo smascheramento dei siti

antigenici, per il riscontro di ER, PR, erbB2, CK14, CK19, p63, calponina è stata effettuato in tampone Citrato a pH 6 e per CK 5/6 in Tampone EDTA a pH 8, in microonde a 750 W, con 2 cicli da 5' e successivo raffreddamento per 20 minuti a T° ambiente. Le sezioni sono state incubate over night a 4°C con gli anticorpi primari anti-CK14, CK19, p63, calponina. Le specifiche tecniche degli anticorpi sono riassunte in **Tabella 2**. Un'incubazione per 1 h a T° ambiente era prevista per ER, PR ed erbB2. Come sistema di rivelazione della reazione immunostochimica è stato utilizzato un kit commerciale Streptoavidina-Biotina-Perossidasi (DAKO, LSAB+System-HRP). Il cromogeno utilizzato è la Diaminobenzidina (DAB, SIGMA). I vetrini sono stati controcolorati con Ematossilina di Papanicolau. Come controlli positivi per ER e PR è stato usato utero di cane, cute per CK5/6, -CK14, -CK19, -p63, mammella normale di cane per calponina e carcinoma mammario umano per erbB2. Il controllo negativo è stato ottenuto con omissione sulle sezioni di utero, cute, mammella normale di cane e carcinoma mammario umano dell'anticorpo specifico e sua sostituzione con altro anticorpo primario di medesimo isotipo ma di irrilevante specificità.

La reazione immunostochimica è stata valutata secondo le recenti linee guida di valutazione sulla valutazione dei marcatori epiteliali, mioepiteliali, HER2, e recettori ormonali dei tumori mammari del cane (Peña *et al.*, 2014).

I sottotipi tumorali sono definiti come:

- Luminal A: ER+ e/o PR+, ERBB2-, indipendentemente dai risultati delle CK5/6, CK14, p63.

- Luminal B: ER+ e/o PR+, ERBB2+, indipendentemente dai risultati delle CK5/6, CK14, p63.
- erbB2 arricchito: ER-, PR-, ERBB2+, indipendentemente dai risultati delle CK5/6, CK14, p63.
- Basal-like: ER- e PR-, ERBB2-, CK5/6 + e/o CK14+ e/o p63+.
- Null-type: Negativo a tutti i marcatori.

Tabella 2: Specifiche tecniche degli anticorpi utilizzati.

ANTICORPO	CLONE	PRODUTTORE	DILUIZIONE
ER	Policlonale	Zymed Laboratories Inc., S. Francisco, CA, USA	1: 50
PR	PR4-12	Oncogene TM Res Prod., Boston, MA, USA	1: 100
erbB2	Policlonale	Dako, (Glostrup, Denmark)	1: 250
CK5/6	D5/16B4	Zymed (South San Francisco, Ca)	1: 300
CK14	Ab-1 (LL002)	NeoMarkers (Fremont, Ca)	1: 300
CK19	BA 17	Dako (Glostrup, Denmark)	1: 50
p63	4A4	Dako (Glostrup, Denmark)	1:50
Vimentina	V9	Dako (Glostrup, Denmark)	1:600
Calponina	CALP	Dako (Glostrup, Denmark)	1:2000

Istochimica

Le colorazioni istochimiche utilizzate per la formulazione di un algoritmo finalizzato ad individuare la componente chimica dei carcinoma mammari a cellule chiare erano:

- acido periodico-reattivo di Schiff (PAS):
- PAS diastasi (dPAS):
- Alcian Blu
- Sudan III

Quest'ultimo è stata effettuato solo su sezioni fissate in formalina e congelate.

I controlli positivi utilizzati erano intestino per PAS, fegato con glicogenosi per dPAS, cartilagine per Alcian Blu e un lipoma per Sudan III.

Microscopia elettronica

I campioni erano disponibili come materiale fissato in formalina e incluso in paraffina. Sui blocchi di paraffina è stata identificata l'area di interesse e l'eccesso di paraffina è stato eliminato. Le sezioni sono state sparaffinate in xilene e sono stati effettuati dei passaggi in etanolo a concentrazione decrescente (100%, 95%, 70%) fino alla reidratazione delle sezioni in acqua distillata e immersione overnight in tampone cacodilato 0,15 M. I campioni reidratati sono stati post-fissati in tetrodossido di osmio (OsO₄) all'1% in tampone cacodilato, disidratate in etanolo ed inserire in Araldite. Le sezioni

fini, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, sono state esaminate con un Microscopio Elettronico a Trasmissione Philips 400T.

Algoritmo Istochimico e Ultrastrutturale per la diagnosi dei carcinomi a cellule chiare

Basandosi su quanto riportato in letteratura per la differenziazione dei carcinomi a cellule chiare nella donna (Rosen *et al.*, 2001) sono state riassunte in **Tabella 3**, le principali colorazioni istochimiche e le caratteristiche ultrastrutturali utilizzate nella diagnosi del carcinoma apocrino, del carcinoma glycogen-rich, del carcinoma lipid rich e del carcinoma secretorio. In diagnosi differenziale è stato inoltre aggiunto, nel cane, il mioepitelioma, individuato con metodica immunohistochimica per la positività a p63, CK14, e calponina (Peña *et al.*, 2014).

Tabella 3: Algoritmo istochimico, immunoistochimico e ultrastrutturale per la differenziazione dei carcinoma mammari a cellule chiare del cane.

	PAS	PAS DIASTASI	ALCIAN BLU	SUDAN III	TEM	IHC
MIOEPITELIOMA	\	\	\	\	Sottili filamenti delle cellule muscolari lisce	p63, CK14, calponina
CARCINOMA APOCRINO	Positive	resistente	/	/	Granuli osmiofili e numerosi organelli	\
CARCINOMA GLYCOGEN-RICH	Positive	labile	positivo focale	negativo	Glicogeno bordato da membrana	\
CARCINOMA LIPID-RICH	negativo	negativo	/	positivo	Goccioline lipidiche	\
CARCINOMA SECRETORIO	positivo	positivo	positivo	/	Secrezioni in vacuoli bordati da membrana	\

3.2.3 Risultati

Stadio e grado istologico

I casi esaminati con diagnosi di lipid rich, avevano invasione dello stroma tumorale in 5 di 9 casi (Stadio istologico I secondo Gilbertson *et al.*, 1983) e in 4 di 9 casi era presente oltre all'invasione anche la presenza di emboli linfovascolari (1/4) o metastasi linfonodali (3/4) (Stadio istologico II secondo Gilbertson *et al.*, 1983). Otto su 9 tumori avevano un grado istologico III (alto grado), 1/9 tumori aveva un grado istologico II (grado intermedio) secondo Pena *et al.*, 2013. Morfologicamente le neoplasie esaminate erano multilobulari, scarsamente demarcate, non capsulate, densamente cellulari, supportate da un moderato stroma fibrovascolare. Le neoplasie erano generalmente composte da lobuli, cordoni e tappeti solidi di cellule

poligonali, con limiti citoplasmatici variabilmente distinti, una quantità di citoplasma da moderata ad abbondante variabilmente granulare chiara o con vacuoli netti otticamente vuoti (**Fig. 1**); il rapporto nucleo-citoplasmatico era da intermedio a basso. I nuclei erano ovali con cromatina finemente granulare e nucleoli evidenti.

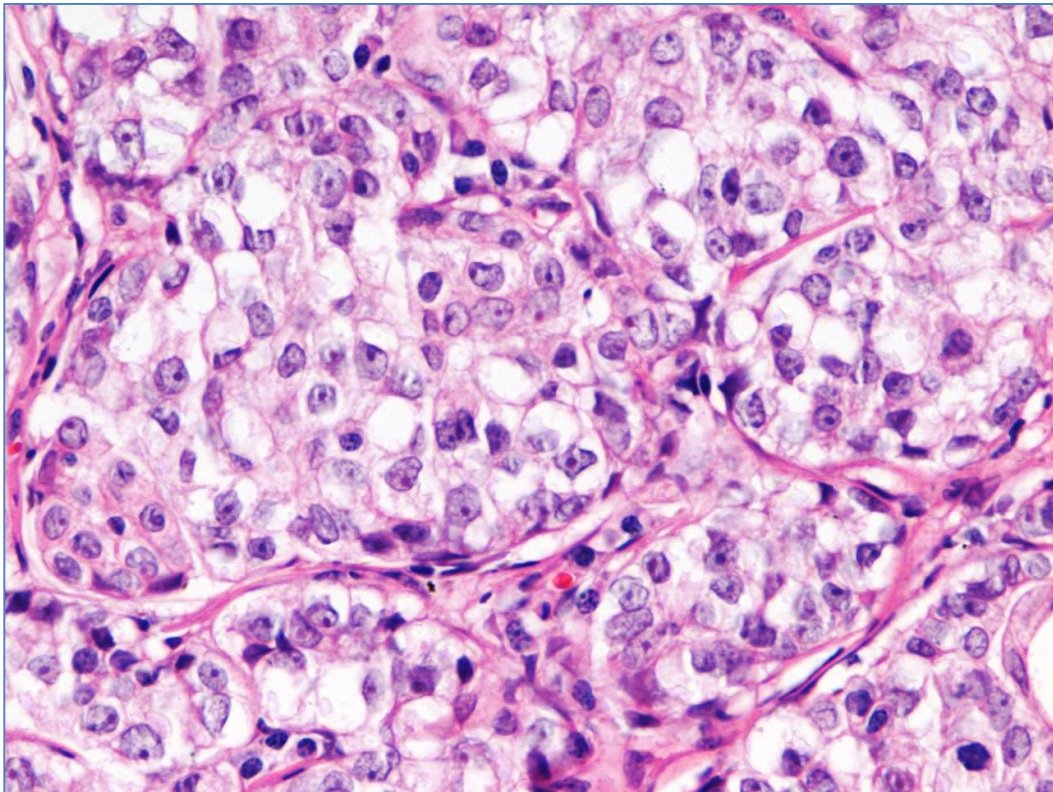


Figura 1: Carcinoma a cellule chiare: vacuolizzazioni citoplasmatiche otticamente vuote, 20x. EE.

Immunoistochimica e profilo molecolare

Dei casi esaminati tutti i tumori (9/9) presentavano assenza di espressione nucleare del recettore per gli estrogeni (ER). In 2/9 era presente

espressione nucleare del recettore per il progesterone (PR). L'espressione del recettore tirosin chinasi erbB2 era presente con un positività di membrana debole, incompleta (Pena *et al.*, 2014), e pertanto con punteggio 1+, in 4/9 tumori. In 5/9 casi l'espressione di erbB2 era completamente assente (0). La CK19, citocheratina luminale, era espressa a livello citoplasmatico e di membrana (**Fig. 2**) in 7/9 casi. Le citocheratine basali, CK14 e CK5/6 (**Fig. 3**), erano espresse in 5/9 e 4/9 casi, rispettivamente. Il marcatore mioepiteliale p63, era presente solo in un caso su 9.

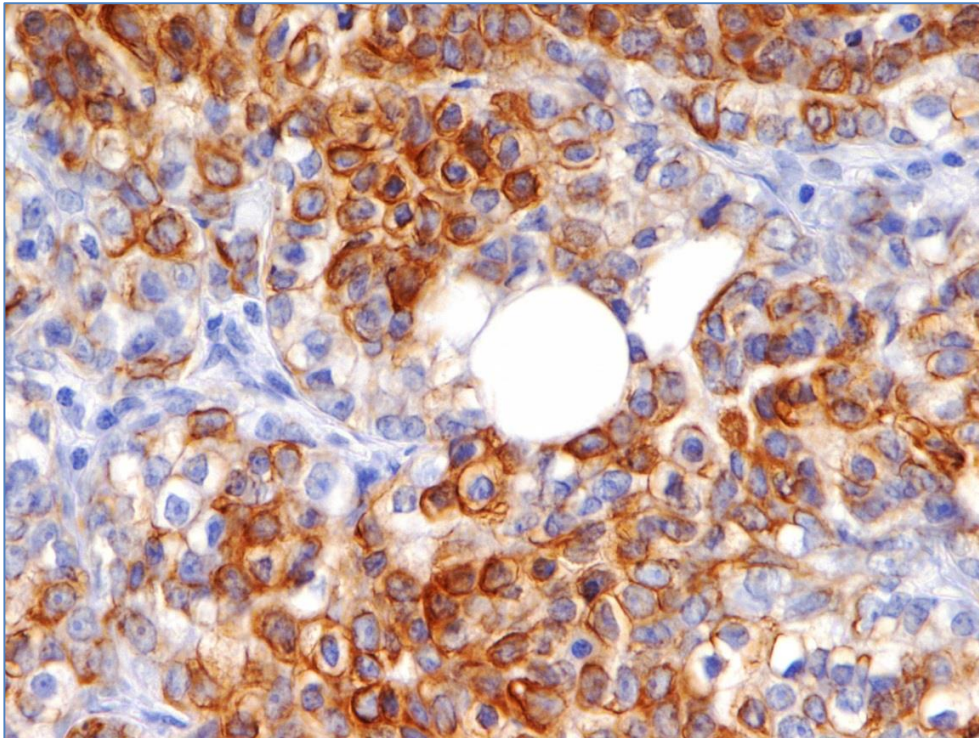


Figura 2: Carcinoma a cellule chiare con reattività citoplasmatica e di membrana per CK19, 40x, DAB.

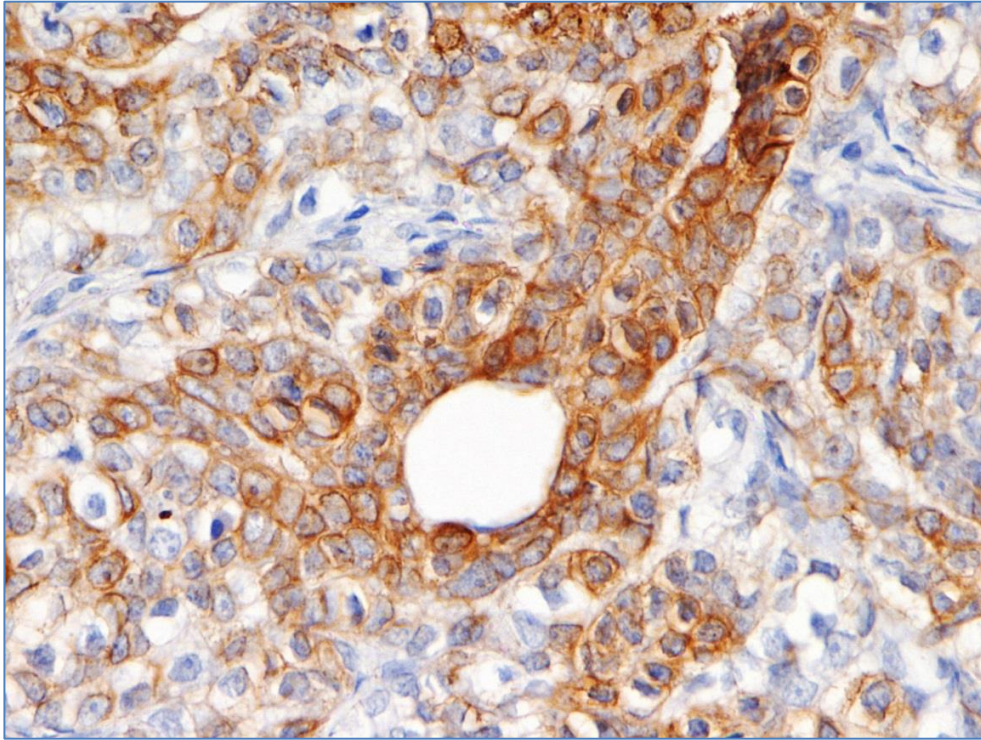


Figura 3: Carcinoma a cellule chiare con reattività citoplasmatica e di membrana per CK5/6, 40x, DAB.

La vimentina era assente in 8/9 tumori e ed era invece espressa in maniera forte ed intensa nel citoplasma delle cellule neoplastiche di un singolo caso. In questo caso è stata effettuata l'immunoistochimica per calponina, presente con una espressione moderata e diffusa nel citoplasma della totalità delle cellule neoplastiche. In 2 di 9 casi è stato possibile formulare la diagnosi di mioepitelioma, con positività per CK19 assente o <10% in entrambi i casi e positività per vimentina e calponina in un caso e per p63 nel secondo caso. Nelle metastasi linfonodali, la CK19 era espressa in tutti i casi, la CK14 in 2/3 e la CK5/6 in 1/3 casi, ER, PR, ed erbB2 erano negativi in tutte le metastasi linfonodali.

I fenotipi molecolari ottenuti sulla base degli algoritmi noti in medicina veterinaria (Sassi *et al.*, 2010; Beha *et al.*, 2012) sono: 2 Luminal A, 6 basal like ed 1 null-type. I tre casi con metastasi linfonodale presentavano un fenotipo basal-like nel tumore primario, che veniva mantenuto nella metastasi linfonodale in 2/3 casi e diventava di tipo null-type per la perdita di espressione di CK14 in un caso.

Istochimica

La natura della vacuolizzazioni è stata investigata con le colorazioni PAS, dPAS, Sudan III ed Alcian Blu. La colorazione di PAS era fortemente positiva in un caso, con colorazione citoplasmatica granulare diffusa e con effetto di polarizzazione eccentrica del materiale PAS positivo (**Fig. 4**) sia nel tumore primario che nelle metastasi linfonodali. Successivamente al trattamento con diastasi la PAS positività veniva abolita (**Fig. 5**), e pertanto il materiale è stato interpretato come glicogeno. Le altre neoplasie erano negative per PAS, dPAS. Nessuna neoplasia era positiva per Alcian blu. In 4/9 casi, in cui è stato possibile congelare il materiale, è stato effettuato il Sudan III, che ha evidenziato i lipidi, con una percentuale di colorazione variabile.

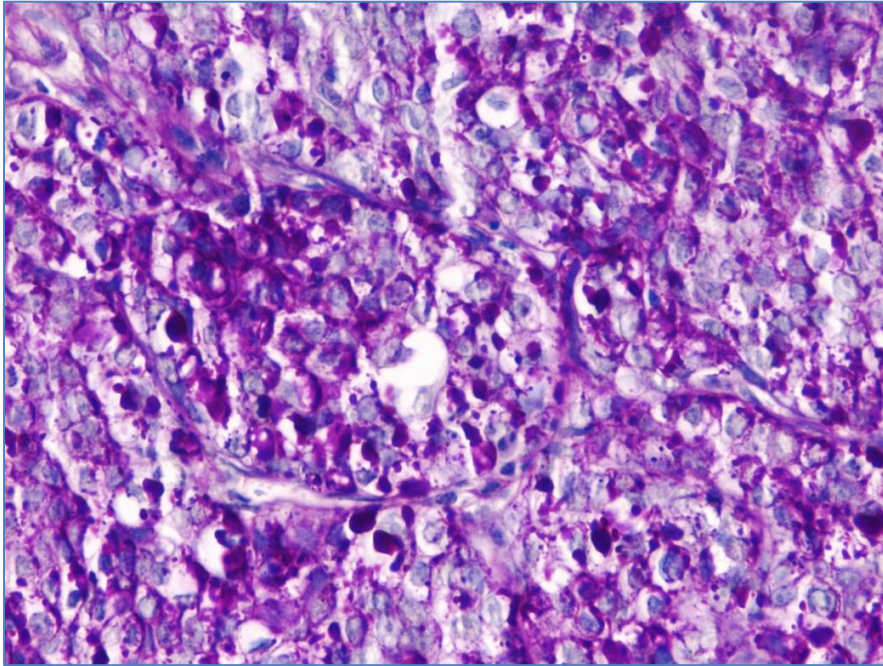


Figure 4: Carcinoma a cellule chiare: presenza di materiale PAS positivo citoplasmatico granulare, 40x, PAS.

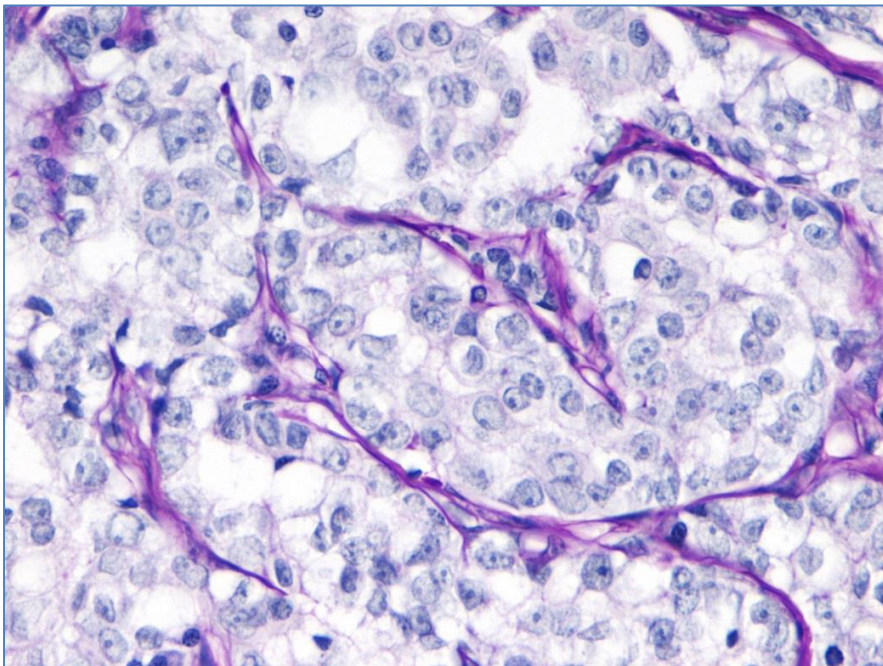


Figura 5: Carcinoma a cellule chiare: assenza di materiale PAS positivo, successivamente a digestione con diastasi 40x, dPAS.

Microscopio elettronica

Il materiale disponibile per la microscopia elettronica era di 5/9 tumori. In 3 su 5 è stata confermata la diagnosi di lipid-rich, per la presenza di numerosi globuli lipidici moderatamente elettrondensi non delineati da membrana oppure presenti come aree elettronlucenti a causa dell'estrazione dei lipidi durante la processazione. In un caso il citoplasma delle cellule neoplastiche era fortemente dilatato dalla presenza di abbondante materiale elettrondenso composto da numerosi granuli liberi di 15-30 nanometri, interpretato come glicogeno di tipo beta (**Fig. 6**).

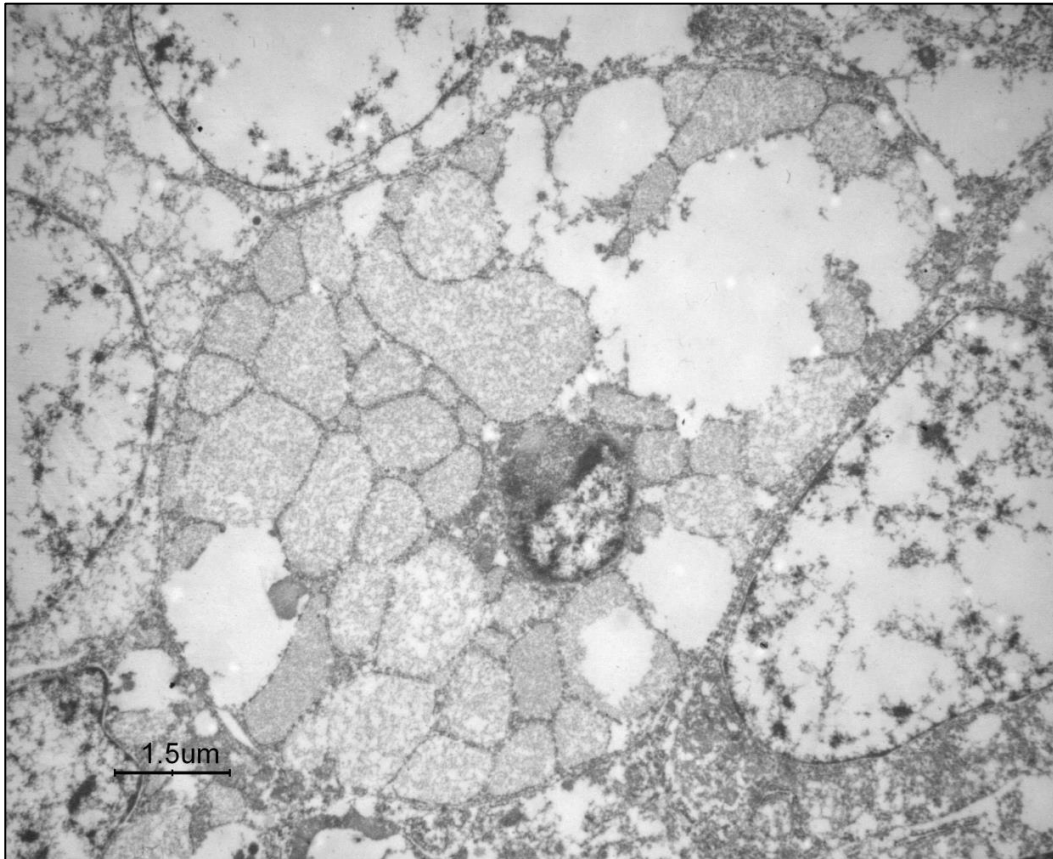


Figura 6: Cellule neoplastiche, con presenza di abbondante materiale granulare elettrondenso, riferibile a glicogeno, TEM.

3.2.4 Discussione

I carcinomi a cellule chiare di tipo glycogen-rich sono un raro sottotipo di carcinoma mammario invasivo, in cui almeno il 90% delle cellule neoplastiche hanno citoplasma chiaro contenete glicogeno (Tavassoli *et al.*, 2007). Nel presente lavoro sperimentale è stato descritto per la prima volta il sottotipo istologico glycogen-rich nel cane, caratterizzato da cellule neoplastiche contenenti materiale granulare PAS positivo e granuli PAS labili dopo digestione con diastasi.

I carcinomi lipid-rich del cane sono le uniche neoplasie a cellule chiare che rientrano nella classificazione dei tumori mammari del cane (Goldschmidt *et al.*, 2011). I lipid-rich sono descritti come neoplasie composte da cellule da rotonde ad ovali con abbondante citoplasma contenente uno o più vacuoli otticamente vuoti che dislocano perifericamente il nucleo (Goldschmidt *et al.*, 2011). Sulla base della morfologia, nei casi che abbiamo esaminato, solo 5 di 9 neoplasie, calzavano strettamente queste caratteristiche citologiche. Nel caso risultato PAS positivo e dPAS labile, le cellule avevano un rapporto N:C intermedio, con una moderata quantità di citoplasma debolmente eosinofilo finemente granulare con vacuolizzazioni citoplasmatiche che solo occasionalmente dislocavano perifericamente il nucleo, il quale era generalmente centrale. La caratteristica tipica dei carcinomi glycogen-rich umani, sono il cosiddetto aspetto “a uovo fritto”, con citoplasma chiaro e nuclei piccoli e ipercromatici (Rosen *et al.*, 2001).

Nella maggior parte dei casi osservati era presente un fenotipo basal-like, come occorre nei carcinomi lipid-rich (Russo *et al.*, 2009) e nei glycogen-rich umani (Kim *et al.*, 2012), indicativo di un comportamento biologico aggressivo e di una prognosi infausta (Russo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). L'assenza di reattività per erbB2, confermava quanto riportato in letteratura nel cane (Rezaie *et al.*, 2011) e nella donna (Kim *et al.*, 2012). L'espressione delle citocheratine luminali dimostrava l'origine ghiandolare delle neoplasie (Abd El-Rehim *et al.*, 2004) in 7/9 carcinomi a cellule chiare. In 2 casi l'assenza di espressione della CK19, e la diffusa espressione di

CK14, calponina e p63, era indicativo di un fenotipo mioepiteliale (Peña *et al.*, 2014).

Il riscontro diagnostico di mioepiteliomi e del carcinoma glycogen-rich PAS positivo e dPAS labile, in tumori precedentemente diagnosticati come carcinomi lipid-rich, suggerisce che la presenza di vacuolizzazioni citoplasmatiche sono un parametro istologico poco specifico e che è necessario l'utilizzo di PAS, PAS diastasi, Sudan III e marcatori mioepiteliali come strumento diagnostico differenziale per i carcinomi mammari a cellule chiare del cane.

3.2.5 Conclusione

Il carcinoma glycogen-rich può essere considerato un nuovo sottotipo istologico di carcinoma mammario del cane, con presenza di citoplasma chiaro, granuli PAS positivi e dPAS labili, esprimenti un fenotipo triplo negativo. L'utilizzo di marcatori mioepiteliali, di PAS, dPAS e Sudan III, viene raccomandato come strumento diagnostico differenziale nei carcinomi mammari a cellule chiare del cane.

3.2.6 Bibliografia

- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. Expression of luminal and basal

- cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):661-71.
- Cassali GD, Gobbi H, Gartner F, Schmitt FC. Secretory carcinoma of the canine mammary gland. *Vet Pathol.* 1999 Nov;36(6):601-3.
 - Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol.* 1983; 20(2):127-42.
 - Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):117-31.
 - Kim SE, Koo JS, Jung WH. Immunophenotypes of glycogen rich clear cell carcinoma. *Yonsei Med J.* 2012 Nov 1;53(6):1142-6.
 - Lester S. The breast. In: *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
 - Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, Cuesta P, Pérez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* 2013 Jan;50(1):94-105.
 - Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, de las Mulas JM. Canine

mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2014 Jan;51(1):127-45.

- Rezaie A, Esmaeilzadeh S, Naddaf H. Lipid rich carcinoma and solid carcinoma in mammary gland of a dog: histopathologic and immunohistochemical features. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology.* Vol. 3, No. 1, 2011, 57-64.
- Rosen PP. Glycogen-rich carcinoma. In: *Rosen's Breast Pathology*, Lippincot-Raven. 2001.
- Russo S, Coppola D, Vinaccia P *et al.* Lipid-rich histology in a basal-type immuno-profile breast carcinoma: a clinicopathological histochemical and immunohistochemical analysis of a case. *Rare Tumors.* 2009 Dec 28;1(2):e41.
- Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res.* 2010 Jan 28;6:5.
- Tavassoli FA, Deville P, eds. *Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Pathology and Genetics.* Lyon, France: IARC Press; 2003.

3.

I FATTORI DI CRESCITA COME PROMOTORI DELL'ANGIOGENESI TUMORALE

La vascolarizzazione dei tumori è essenziale per la crescita tumorale. Nonostante i tumori maligni possiedano tutte le aberrazioni genetiche per la trasformazione maligna, non possono crescere più di 1-2 mm di distanza dal vaso, se non possiedono la capacità di promuovere l'angiogenesi (Kumar *et al.*, 2015). Oltre la crescita del tumore, l'angiogenesi promuove inoltre la disseminazione metastatica delle cellule neoplastiche (Kumar *et al.*, 2015).

Normalmente l'angiogenesi non tumore-associata, come ad esempio nella riparazione delle ferite, occorre attraverso un bilancio tra promotori e inibitori dell'angiogenesi stessa (Kumar *et al.*, 2015). In generale la formazione di vasi nelle neoplasie avviene mediante un meccanismo detto "angiogenic switch" attraverso il quale termina lo stadio di quiescenza vascolare e si ha una maggiore produzione di fattori pro-angiogenici con perdita degli inibitori dell'angiogenesi (Kumar *et al.*, 2015).

I meccanismi di vascolarizzazione tumorale sono numerosi. Il meccanismo maggiormente descritto è quello di "sprouting angiogenesis" letteralmente, angiogenesi per gemmazione, attraverso il quale le cellule tumorali inducono la propria vascolarizzazione attraverso la gemmazione di capillari neoformati a partire dai vasi preesistenti, in risposta all'attività di numerosi fattori di crescita, tra i cui il fattore di crescita dell'endotelio vascolare

(VEGF), l'angiopoietina, il fattore di crescita trasformante (TGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e il fattore di crescita delle piastrine (PDGF) (Dome *et al.*, 2007). Un altro meccanismo di angiogenesi è quello di "vessel co-option", durante il quale le cellule neoplastiche invadono i vasi dell'ospite e crescono in stretto contatto con la superficie degli stessi, sotto stimolo di VEGF ed angiopoietina (Dome *et al.*, 2007). Inoltre, l'angiogenesi tumorale può accadere mediante il processo di "Intussusceptive microvascular growth", in cui la formazione della rete vascolare avviene con l'inserzione di colonne di tessuto connettivo (pilastrici di tessuto) che determinano il frazionamento del lume vascolare (Dome *et al.*, 2007). I principali fattori per questo tipo di angiogenesi sono il PDGF, TGF- β ed angioproteina (Dome *et al.*, 2007). Diverso dall'angiogenesi è il meccanismo di vasculogenesi, definito come la differenziazione *in situ* delle cellule endoteliali vascolari a partire da precursori primitivi, la quale normalmente avviene durante l'embriogenesi (Dome *et al.*, 2007). Un meccanismo di vasculogenesi post-natale è quello della "vasculogenic mimicry", così chiamato per la capacità delle cellule neoplastiche di formare strutture simil-capillari mimanti il pattern vascolare embrionale (Folberg *et al.*, 2004).

La proliferazione microvascolare glomeruloide, composta da aggregati vascolari disordinati e complessi descritti in associazione a neoplasie ad alto grado come il glioblastoma (Louis *et al.*, 2007), non trova ancora paternità eziologica ed è oggetto di dibattito.

Bibliografia

- Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):1-15.
- Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS.* 2004 Jul-Aug;112(7-8):508-25.
- Kumar V, Abbas AK, Aster. Neoplasia. In: Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds), 2007, IARC, Lyon, WHO.

3.1.

PROLIFERAZIONE MICROVASCOLARE GLOMERULOIDE E FATTORI DI CRESCITA DELL'ANGIOGENESI NEI TUMORI DEI PLESSI COROIDEI DEL CANE

(Contributo sperimentale)

I tumori dei plessi coroidei sono neoplasie intraventricolari derivate dall'epitelio dei plessi coroidei, costituenti il 7% delle neoplasie primarie cerebrali del cane (Vandeveld *et al.*, 2012). Macroscopicamente, queste neoplasie, sono ben demarcate, a crescita espansiva, localizzate nel sistema ventricolare, hanno un aspetto da granulare a papillare, di colore da grigiastro a roseo (**Fig. 1**), e causano compressione del parenchima cerebrale adiacente (Louis *et al.* 2007; Vandeveld *et al.*, 2012). I tumori dei plessi coroidei nel cane occorrono più frequentemente a livello del IV ventricolo, ma possono essere presenti a livello dei ventricoli laterali e del III ventricolo (Vandeveld *et al.*, 2012).



Figura 1: Aspetto macroscopico di un tumore dei plessi coroidei localizzato a livello di IV ventricolo (cortesia della Prof.ssa Anna Oevermann).

La crescita estrusiva unilaterale attraverso l'apertura laterale del IV ventricolo (**Fig. 1**) è comune nel cane.

I tumori dei plessi coroidei, nell'uomo, sono classificati secondo il sistema classificativo WHO dei tumori del sistema nervoso centrale (Louis *et al.* 2007) in papillomi dei plessi coroidei (CPP, grado I), papillomi atipici dei plessi coroidei (aCPP, grado II) e carcinomi dei plessi coroidei (CPC, grado III). Questo sistema classificativo è stato assunto nel cane, per via delle omologie istopatologiche con i tumori umani (Westworth *et al.*, 2008). Poco è noto riguardo il valore predittivo del sistema umano rispetto al comportamento biologico, la recidiva e la prognosi dei tumori dei plessi coroidei del cane. Uno studio di meta-analisi su 566 tumori dei plessi coroidei umani ha rivelato che l'indice di sopravvivenza in 10 anni, era del 77% per i CPP e del 35% per i CPC. I CPC sono tumori altamente aggressivi e necessitano di essere distinti dai papillomi e dai papillomi atipici, di fatto correntemente il grado istologico risulta indicativo per terapie appropriate, come la terapia neoadiuvante (Sun *et al.*, 2014). In carcinomi non completamente asportabili chirurgicamente, una combinazione di chemioterapia e radioterapia può risultare di beneficio terapeutico (Sun *et al.*, 2014).

L'apporto vascolare è di fondamentale importanza per la crescita e la disseminazione metastatica dei tumori maligni (Zecchin *et al.*, 2015; Akslen *et al.*, 2011).

La proliferazione microvascolare si verifica frequentemente negli oligodendrogliomi e negli astrocitomi ad alto grado (oligodendroglioma III, glioblastoma multiforme), e per questo viene utilizzata come elemento istopatologico caratteristico di malignità (**Fig. 2**) (Louis *et al.* 2007).

L'indice che valuta lo stato angiogenico della vascolarizzazione tumorale è denominato densità microvascolare (Brem *et al.*, 1972). Un elevato indice di densità microvascolare è un fattore prognostico correlato nell'uomo a tumori dei plessi coroidei ad alto grado (Tena-Suck, 2015).

La proliferazione microvascolare-tumore associata (MVP) morfologicamente è costituita da cellule endoteliali, pericitarie e muscolari lisce, multistrato e mitoticamente attive (Louis *et al.* 2007). La proliferazione microvascolare, nei gliomi umani e canini, è spesso definita di tipo glomeruloide, o corpi glomeruloidi (glomeruloid bodies), così chiamata per la somiglianza con i glomeruli renali (Louis *et al.* 2007; Cantile e Youssef, 2015).

L'analisi ultrastrutturale dei corpi glomeruloidi ha dimostrato che essi sono costituiti da aggregati di capillari neoformati, delineati da endotelio iperplastico e circondati da una lamina basale ed uno strato incompleto di periciti (Brat *et al.*, 2001).

Una semplice iper-vascularità, come stadio precursore della proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide, è stata descritta negli astrocitomi infiltranti a basso grado (grado II), caratterizzata da strutture vascolari normali ma di densità aumentata se comparata con i vasi normali del cervello (Brat *et al.*, 2001) .

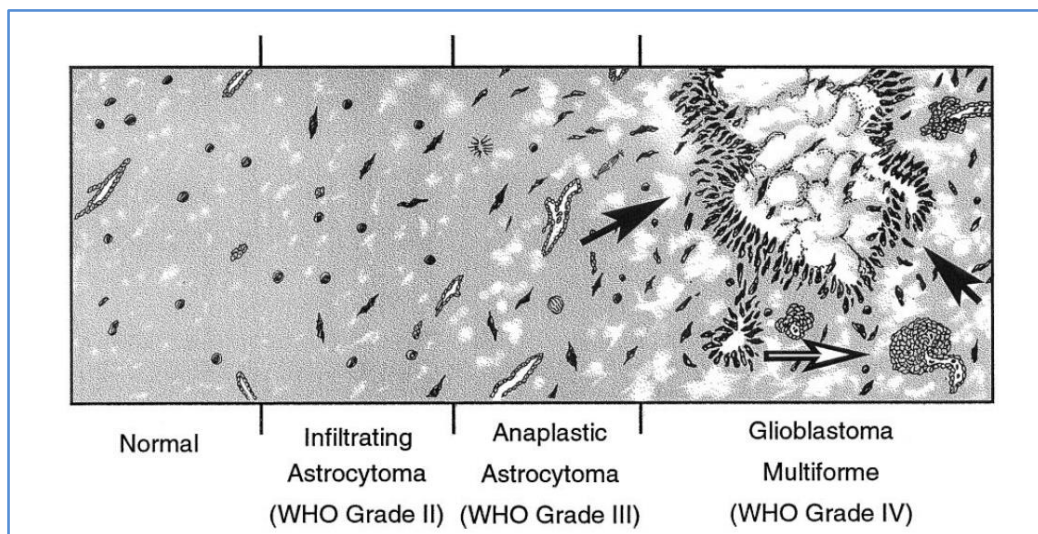


Figura 2: Schema che mostra la progressione istopatologica da astrocitoma infiltrante (grado II) al glioblastoma multiforme (grado IV). Nel grado II, le cellule tumorali sono singole e sparse all'interno del neuropilo; l'architettura dei vasi sanguigni e la densità sono simili alla sostanza bianca cerebrale normale. Nell'astrocitoma anaplastico (grado III) le cellule sono più numerose ed atipiche. Nel glioblastoma multiforme, è prominente l'iperplasia microvascolare, in particolare la proliferazione vascolare glomeruloide (freccia bianca) presente in prossimità della necrosi "pseudopalisata" (freccie nere). (Brat *et al.*, 2001).

La principale teoria sulla patogenesi dei corpi glomeruloidi descrive la loro formazione mediante un meccanismo di cooptazione dei vasi preesistenti da parte delle cellule neoplastiche, che inducono l'apoptosi dei vasi per un meccanismo autocrino di resistenza, la necrosi e l'ipossia delle cellule neoplastiche e dunque l'up-regolazione del fattore di crescita dell'endotelio

vascolare (VEGF) (**Fig. 3**), con successiva angiogenesi per gemmazione (sprouting angiogenesis) (Brat *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2008).

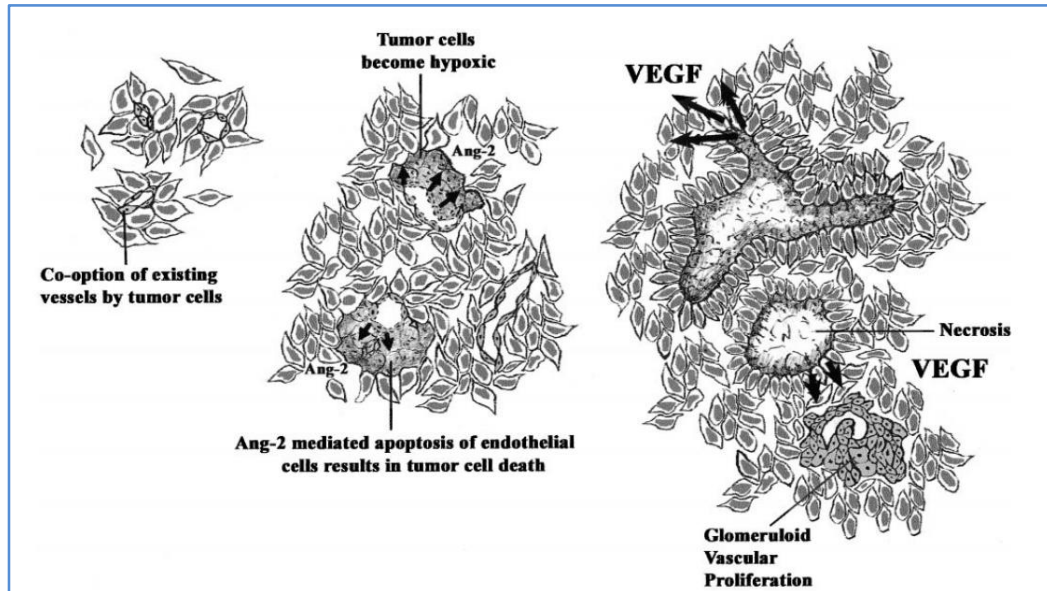


Figura 3: Cooptazione dei vasi preesistenti da parte delle cellule neoplastiche; le cellule endoteliali resistono alla cooptazione rilasciando Ang-2, che agisce in maniera autocrina e causa apoptosi endoteliale e la regressione vascolare in assenza di VEGF. Le cellule neoplastiche nelle immediate vicinanze del vaso degenerato, iniziano ad andare in contro a necrosi disponendosi a pseudopalizzata. Le cellule neoplastiche circostanti divengono ipossiche e up-regolano l'espressione di VEGF, che induce l'iperplasia vascolare e la formazione della proliferazione glomeruloide. (Brat *et al.*, 2001).

L'iniezione locale di un vettore adenovirale, ingegnerizzato per esprimere VEGF, in orecchie di topi atimici, è responsabile della formazione dei corpi glomeruloidi, e delle loro regressione alla sospensione dell'inoculo (Sundberg *et al.*, 2001).

In aggiunta a VEGF, anche il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) si pensa sia implicato nell'ontogenesi della proliferazione microvascolare (Nupponen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Il PDGF è secreto dalle cellule endoteliali durante l'angiogenesi e attiva il suo recettore

tirosin chinasi PDGFR β presente sui periciti (Gerhardt *et al.*, 2008). La produzione locale di PDGF e la ritenzione del suo ligando sono essenziali per il reclutamento dei periciti sia durante la normale angiogenesi che durante la formazione del microambiente tumorale.

In questo studio sperimentale è stata osservata l'occorrenza della proliferazione microvascolare glomeruloide in un sottoinsieme dei tumori dei plessi coroidei (CPT) del cane. La proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide non è ancora stata descritta nei CPT, né nel cane, né nell'uomo.

3.1.1. Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio sperimentale è stato di descrivere le caratteristiche e la prevalenza della proliferazione microvascolare (MVP) nei tumori dei plessi coroidei (CPT) del cane e di investigare la sua associazione con il grado istologico e con l'espressione di fattori di stimolo dell'angiogenesi (VEGF, PDGF) e loro recettori tirosin chinasi.

3.1.2. Materiali e metodi

Il lavoro sperimentale è stato svolto nell'Istituto Neurocenter della Facoltà di Medicina Veterinaria di Berna (CH), sotto la supervisione della Prof.ssa Anna Oevermann e durante il programma di ricerca Marco Polo della durata di 5 mesi.

Collezione della casistica

In questo studio retrospettivo sono stati raccolti un totale di 54 casi di CPT canini. I casi sono stati collezionati dagli archivi di neuropatologia del:

- Neurocenter, Divisione di Ricerca Clinica Sperimentale, Università di Berna,
- Dipartimento di Patologia, Microbiologia e Immunologia, Scuola di Medicina Veterinaria, Davis, Università della California
- Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Perugia.

I criteri di selezione dei casi erano una diagnosi istologica di tumore dei plessi coroidei e la presenza di tessuto cerebrale adiacente al tumore, al fine di valutare la presenza/assenza della proliferazione microvascolare. Tutti i tessuti sono stati ottenuti da casi necroscopici, ad eccezione di due casi bioptici.

Sei plessi coroidei normali (NCP), provenienti da pazienti senza disturbi neurologici, sono stati inclusi come materiale di controllo.

Istologia e grado

I tumori erano disponibili come materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina. Sezioni di 3 micron di spessore sono state tagliate al microtomo a partire da blocchi di paraffina e routinariamente colorate con Ematossilina e Eosina (EE).

I tumori sono stati graduati in accordo con il sistema classificativo WHO del 2007 (**Tabella 1**).

Microscopicamente, i CPP sono strettamente simili ai plessi coroidi normali non neoplastici, e sono costituiti da delicate fronde di tessuto connettivo fibrovascolare, rivestite da un singolo strato di cellule epiteliali uniformi da cuboidali a colonnari con un nucleo da rotondo ad ovale in posizione basale (Louis *et al.*, 2007). Gli aCPP sono definiti come papillomi aventi più di 2 mitosi in un totale di 10 campi a forte ingrandimento (40x) e addizionalmente con 2 di 4 caratteristiche di malignità, come un aumento della cellularità, pleomorfismo nucleare, perdita del pattern papillare e aree di necrosi (Louis *et al.*, 2007). I CPC mostrano palesi segni di malignità, includenti la presenza di almeno 4 delle seguenti 5 caratteristiche istologiche: più di 5 mitosi in 10 campi a 40x, aumento della densità cellulare, pleomorfismo nucleare, perdita del pattern papillare con formazione di tappeti solidi e/o presenza di aree di necrosi (Louis *et al.*, 2007).

Nel parenchima adiacente alla neoplasia e all'interno dello stroma tumorale è stata ricercata la presenza/assenza della proliferazione microvascolare.

Tabella 1: Grado istologico (secondo Westworth *et al.*, 2008)

Grado	Parametri istologici
Grado I (Papilloma)	<2 di figure mitotiche in 10 campi a forte ingrandimento, cambiamenti cellulari e invasione minimi.
Grado II (Papilloma atipico)	≥2 mitosi in 10 campi a forte ingrandimento, e può includere fino a 2 delle seguenti caratteristiche: aumento della cellularità, atipie nucleari, perdita del pattern papillare e aree di necrosi.
Grado III (Carcinoma)	Almeno 4 delle seguenti caratteristiche istologiche: ≥5 figure mitotiche in 10 campi a forte ingrandimento, atipia nucleare, epitelio multistrato, aumento della densità cellulare, perdita del pattern papillare con formazione di tappeti solidi, e/o multifocali aree di necrosi.

Western Blot

I campioni di tessuto utilizzati sono stati: plessi coroidei normali, sostanza bianca cerebrale, midollo osseo e polmone. Ogni campione, composto da 80 mg di tessuto, è stato sospeso e centrifugato in 1 ml di soluzione WB1. I campioni sono stati successivamente risospesi in Laemmli buffer e centrifugati e sottoposti a trattamento termico a 99°C per 5'. Gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) al 15% per il riscontro di VEGF e PDGF e all'8% per il riscontro di PDGFR α e PDGFR β , VEGFR1 e VEGFR2 sono utilizzati per l'elettroforesi delle proteine, ottenuta a 100 Volt per 10' per il gel di impaccamento (stacking gel) seguito da un secondo ciclo a 200 Volt per 50' per il gel di separazione

(resolving gel). Il trasferimento su membrane di nitrocellulosa è stato ottenuto a 85 Volt per 1 ora. I siti di legame aspecifici sono stati bloccati con una soluzione di 1% di latte in polvere in PBS per 1 ora. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate overnight a 4°C con gli anticorpi primari anti -VEGF, -PDGF, -PDGFR α , -PDGFR β , -VEGFR1 e -VEGFR2 diluiti 1:200 in soluzione di blocking. Le proteine d'interesse sono state individuate con l'incubazione delle membrane di nitrocellulosa per 3 ore con l'anticorpo secondario (anti-rabbit HRP) diluito 1:5000 in soluzione di blocking. I siti di legame sono stati rivelati con un kit commerciale con substrato chemiluminescente (Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen). Una membrana di nitrocellulosa sottoposta al medesimo protocollo con omissione dell'anticorpo primario è stata utilizzata come controllo negativo.

Immunoistochimica

Venticinque CPT sono stati selezionati per l'esame immunoistochimico. Per ogni caso esaminato sono state tagliate 8 sezioni seriali dello spessore di 3 micron. Sono stati utilizzati anticorpi anti-actina muscolare liscia (α SMA), fattore di von Willebrand (vWF), ki67, fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), Recettore alfa del fattore di crescita derivato dalla piastrine (PDGFR α), Recettore beta del fattore di crescita derivato dalla piastrine (PDGFR β), Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (**Tabella 2**). Le perossidasi endogene sono state bloccate mediante

immersione delle sezioni in una soluzione di H₂O₂ al 3% in metanolo, per 30' a temperatura ambiente.

Per il riscontro di PDGF, PDGFR α , PDGFR β e vWF è stato effettuato uno smascheramento dei siti antigenici di tipo enzimatico con Proteinasi K (03 115 828 001 Roche 19.2mg/ml) 50 μ l in 50ml TBS 1x per 15 minuti a 37°C in bagno termostatico. Lo smascheramento termico è stata effettuato in tampone citrato a pH 6,0 in microonde a 95°C, per 20' al fine di identificare Ki67 e α SMA, e per 45' per identificare VEGF, entrambi seguiti da raffreddamento a T° ambiente per 20'.

Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi anti- α SMA, -vWF, -ki67, -PDGF, -PDGFR α , -PDGFR β , -VEGF, overnight a 4°C in frigorifero. Le specifiche tecniche degli anticorpi utilizzati sono riassunti in **Tabella 2**.

Il giorno dopo, i siti di legame con l'anticorpo primario sono stati rivelati con un kit commerciale streptoavidina-biotina-perossidasi (LSAB DAKO Kit K500). AEC (DAKO Kit K500) è stata utilizzata come cromogeno. I vetrini sono stati successivamente contro-colorati con ematossilina di Ehrlich.

Come controllo negativo, su sezioni di cervello normale l'anticorpo è stato omesso e sostituito da PBS, al fine di verificare siti di legame aspecifici dell'anticorpo secondario. Al fine di valutare la specificità della reazione immunoistochimica sono stati utilizzati come controlli positivi 6 plessi coroidei normali provenienti da 6 differenti animali morti per cause non neurologiche. Inoltre, come controlli positivi sono stati utilizzati i seguenti tessuti di cane, sottoposti agli analoghi protocolli delle sezioni patologiche

esaminate: linfonodo (per l'anticorpo anti-ki67), vasi di tessuto cerebrale normale (per l'anticorpo anti-PDGFR β) e polmone di cane (per gli anticorpi anti-PDGF, -PDGFR α , -VEGF, - α SMA, -vWF).

Tabella 2: Specifiche tecniche degli anticorpi.

Anticorpo	Clone	Produttore	Diluizione
α SMA	1A4	DAKO, Glostrup, Denmark	1:100
vWF	Polyclonal	DAKO, Glostrup, Denmark	1:400
Ki67	MIB-1	DAKO, Glostrup, Denmark	1:100
VEGF (147) sc-507	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:100
PDGF-B (N-30) sc-127	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:200
PDGFR β (958) sc-432	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:100
PDGFR α	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	1:100

I risultati immunohistochimici di PDGF, PDGFR α , PDGFR β , VEGF sono stati valutati nelle cellule epiteliali tumorali, nei plessi coroidei normali, nella proliferazione microvascolare, ove presente, e nei vasi normali del cervello. La valutazione è stata condotta in maniera semi-quantitativa, valutando la percentuale di cellule immunoreattive e assegnando un punteggio da 0 a 4: 0 (assente), 1 (<10%), 2 (10-50%), 3 (51-80%), 4 (81-100%). Inoltre, è stata valutata l'intensità di colorazione a cui è stato assegnato un punteggio da 0 a 3: 0 (assente), 1 (debole), 2 (distinto) e 3 (forte). I due punteggi venivano in ultimo moltiplicati tra di loro, per ottenere un punteggio finale, che poteva

avere come massimale complessivo 12 (Nupponen *et al.*, 2008). I punteggi ottenuti sono stati ulteriormente suddivisi in 3 gruppi:

- Basso (1-4)
- Intermedio (5-8)
- Alto (9-12)

L'immunoreattività di α SMA and vWF è stata valutata come positiva o negativa. Per l'anticorpo anti-Ki67, è stato calcolato l'indice di proliferazione, ottenuto dalla conta dei nuclei positivi sul totale dei nuclei, in 10 campi a forte ingrandimento (40x). La conta è stata effettuata utilizzando un software di analisi di immagine: ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism 5. La normalità di distribuzione dei dati è stata valutata con il test D'agostino e Pearson omnibus, il test Kolmogorov-Smirnov, ed il test di Shapiro-Wilk. I dati non erano normalmente distribuiti. I dati continui sono stati analizzati con il test di Mann–Whitney fino a 2 gruppi, e con il test di Kruskal-Wallis per più di 2 gruppi. I dati categorici sono stati esaminati con i test Chi-square and Fisher exact, variabilmente sulla base della dimensione del campione. Un valore di $P \leq 0,05$ era considerato significativo.

3.1.3. Risultati

Grado istologico e indice di proliferazione nei tumori

In accordo con il Sistema classificativo WHO (Louis DN *et al.*, 2007), su un totale di 54 tumori, 23 (42%) erano papillomi (**Fig. 4**) e 31 (58%) erano carcinomi (**Fig. 5**). Nessun papilloma atipico (aCPP) è stato identificato. La localizzazione anatomica dei tumori è stata specificata in **Tabella 3; Fig. 6**. In due biopsie (1 papilloma e 1 carcinoma) non è stato possibile identificare la localizzazione anatomica.

I papillomi avevano un indice mitotico <2 in 10 campi a 40x e un moderato numero di essi presentava un aumento della densità cellulare (13/23). Occasionalmente era presente perdita del pattern papillare, epitelio multistrato e focolai di necrosi. La desmoplasia è stata osservata in soli 2 papillomi. Una minima invasione stromale è stata osservata in 4/23 casi e solo un papilloma mostrava diffusione metastatica intraventricolare, evenienza occasionale nei papillomi dei plessi coroidei, seppur con caratteristiche citologiche benigne, come già riportato in letteratura (Giannuzzi *et al.*, 2013).

L'indice mitotico dei carcinomi era <2 in 14 casi (45%), > 2 in 10 (32%), > 5 in 7 (23%), con un range da 1 a 9 mitosi in 10 campi a 40x. I carcinomi erano contraddistinti da importanti caratteristiche di malignità, quali l'aumento della densità cellulare (97%), epitelio multistrato (94%), atipie nucleari (71%) e perdita del pattern papillare (87%). La desmoplasia e la necrosi sono state osservate nel 65% e nel 61% dei casi rispettivamente. L'invasività locale nel

tessuto cerebrale adiacente è stata osservata in 20/26 casi (77%). Inoltre, 7 casi presentavano diffusione intraventricolare metastatica rispetto al sito primario e due di essi avevano diffusione metastatica extraventricolare subaracnoidea spinale. Cinque casi avevano localizzazione subaracnoidea spinale come sede primaria di localizzazione tumorale, senza alcuna evidenza di una sede primaria cerebrale ventricolare.

Il grado istologico non influenzava la dimensione del tumore. La dimensione media era di 10 mm per i papillomi e di 9,84 mm per i carcinomi.

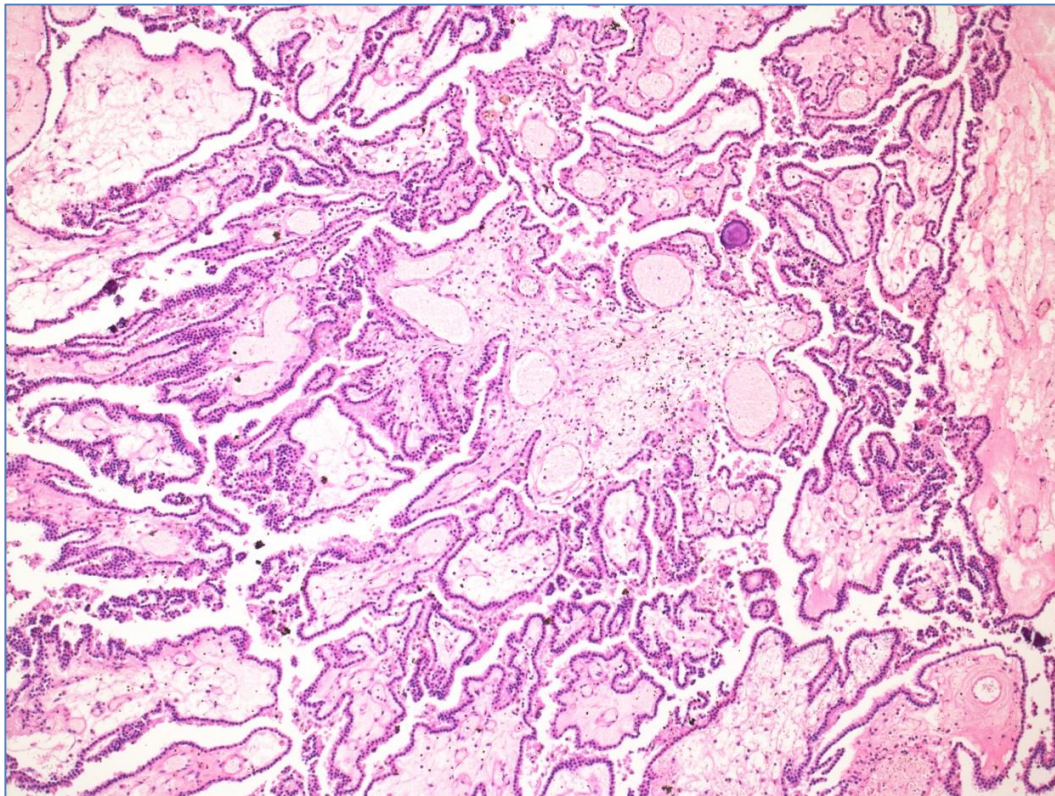


Figura 4: Papilloma dei plessi coroidei: formazioni papillari rivestite da epitelio monostrato, con assenza di atipie cellulari e similarità con i plessi coroidei normali, 4x, EE.

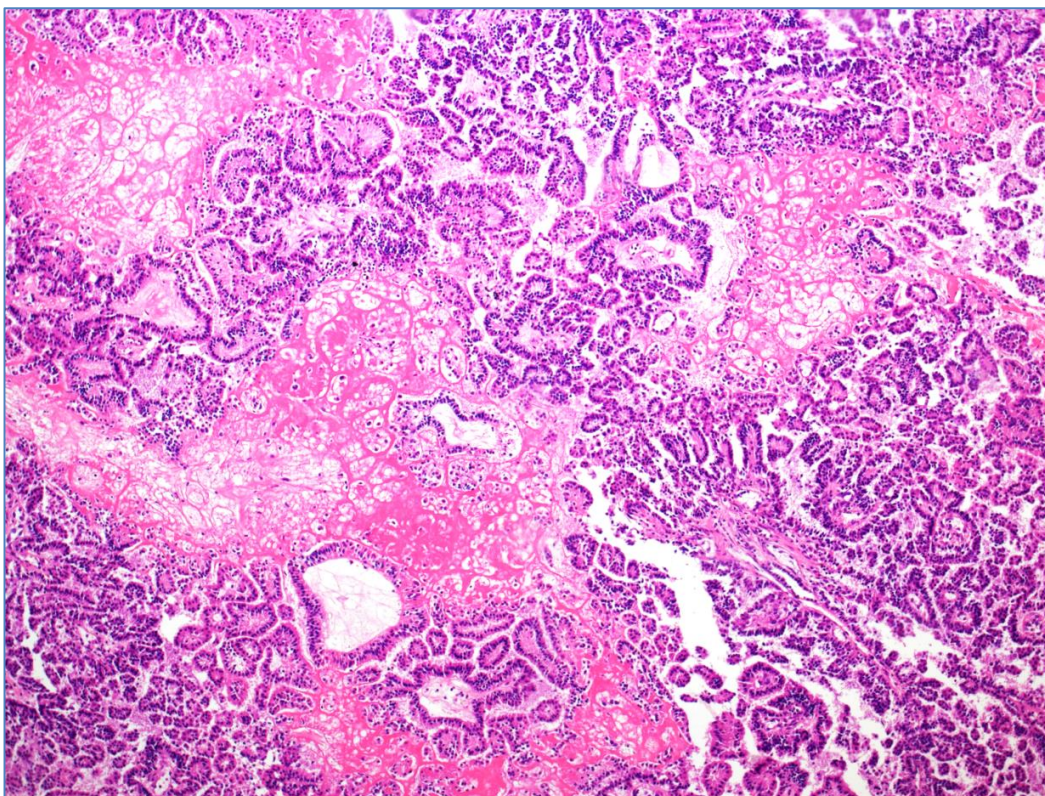


Figure 5: Carcinoma dei plessi coroidei, cellule epiteliali in multistrato con perdita del pattern papillare e formazione di vaste aree di necrosi, 4x, EE.

Tabella 3: Localizzazione anatomica dei tumori dei plessi coroidei

	CPT		CPP		CPC	
	N	%	n	%	n	%
IV ventricolo	25	46%	11	48%	14	45%
III ventricolo	7	13%	1	4%	6	19%
Ventricoli laterali	15	28%	10	43%	5	16%
Midollo spinale	5	9%	0	0%	5	16%
Biopsie	2	4%	1	4%	1	3%
Totale	54	100	23	100	31	100

CPT: tumori dei plessi coroidei; CPP: papillomi dei plessi coroidei; CPC: carcinomi dei plessi coroidei; n: numero di casi; %: percentuale di casi

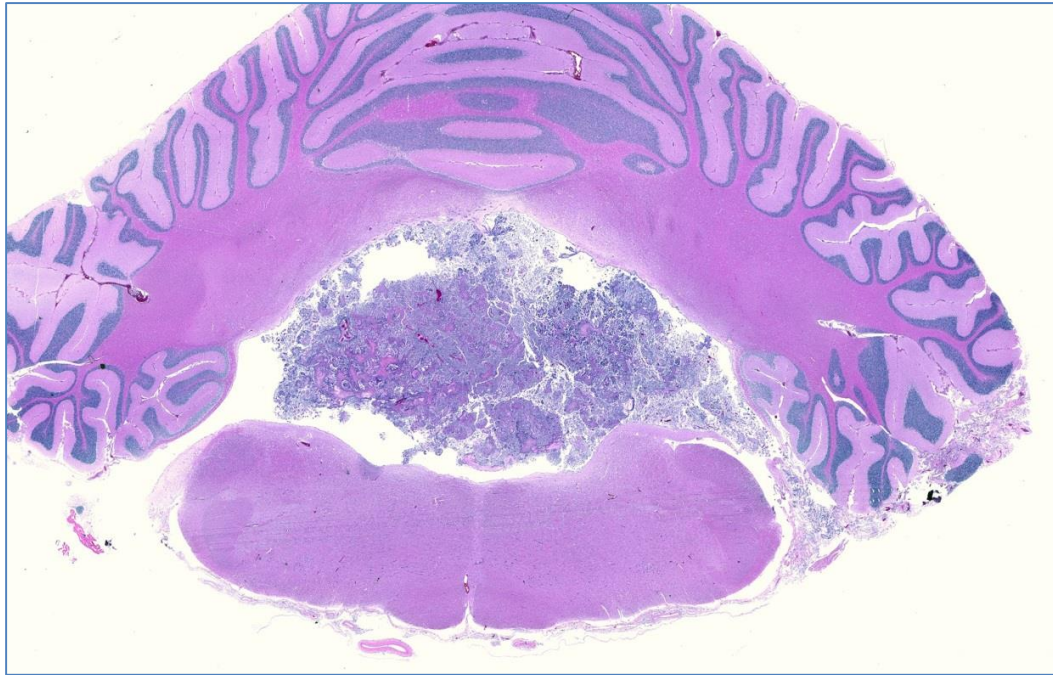


Figure 6: Carcinoma dei plessi coroidei, localizzazione anatomica a livello di IV ventricolo, 1x, EE.

L'indice di proliferazione ki67 era di $1,031 \pm 0,441\%$ (media \pm deviazione standard) per i papillomi, con un valore mediano di $0,9435\%$ (range $0,5930-1,644\%$). I carcinomi avevano un indice di proliferazione ki67 di $8,316 \pm 7,385\%$ (media \pm deviazione standard), con un valore mediano di $5,149\%$ (range $1,55-24,75\%$). Il grado istologico dei tumori dei plessi coroidei correlava significativamente con l'indice di proliferazione (Mann-Whitney test $P=0,0033$), essendo marcatamente più elevato nei carcinomi rispetto ai papillomi (**Grafico 1**). Assumendo il più alto indice ki67 dei papillomi ($1,644\%$), come valore di cut-off nella distinzione tra papillomi e carcinomi, questo valore ha un accuratezza per la diagnosi di carcinoma di una sensibilità del $94,44\%$ e una specificità del $99,99\%$.

I carcinomi con proliferazione microvascolare glomeruloide hanno un indice Ki67 tendenzialmente più alto (11.5 ± 8.6 , media \pm DS) rispetto ai carcinomi in cui questa caratteristica è assente (4.9 ± 4.1) ($P=0.07$).

Ki67 nei plessi coroidei normali era espresso solo raramente, con un indice di proliferazione di $0.17 \pm 0.1759\%$ (media \pm DS).

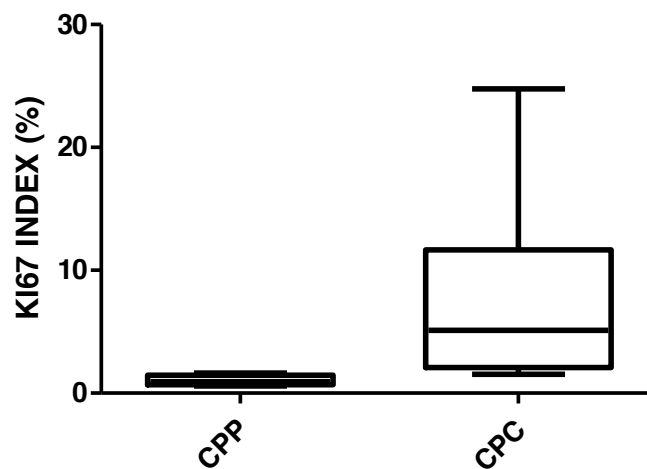


Grafico 1: Indice di proliferazione Ki67 nei papillomi (CPP) e nei carcinomi (CPC) dei plessi coroidei. L'indice è significativamente più alto nei carcinomi ($P= 0,0033$).

Proliferazione microvascolare

La proliferazione microvascolare associata al tumore è stata osservata in 35/54 (65%) tumori. Sono stati osservati due tipi di proliferazione microvascolare: la semplice ipervascolarità ed i corpi glomeruloidi. La semplice ipervascolarità era caratterizzata da un aumento della densità dei vasi, composti da un singolo lume vascolare, delineato da un endotelio vascolare rigonfio e circondati da cellule murali (**Fig. 7**). Questo tipo di proliferazione microvascolare occorreva in 12/23 papillomi (52%) e in 23/31 carcinomi (74%). I corpi glomeruloidi descrivevano strutture glomerulari aberranti ed erano caratterizzati da canali vascolari multipli caoticamente rivestiti da un esuberante proliferazione di cellule murali rigonfie e disorganizzate (**Fig. 8**).

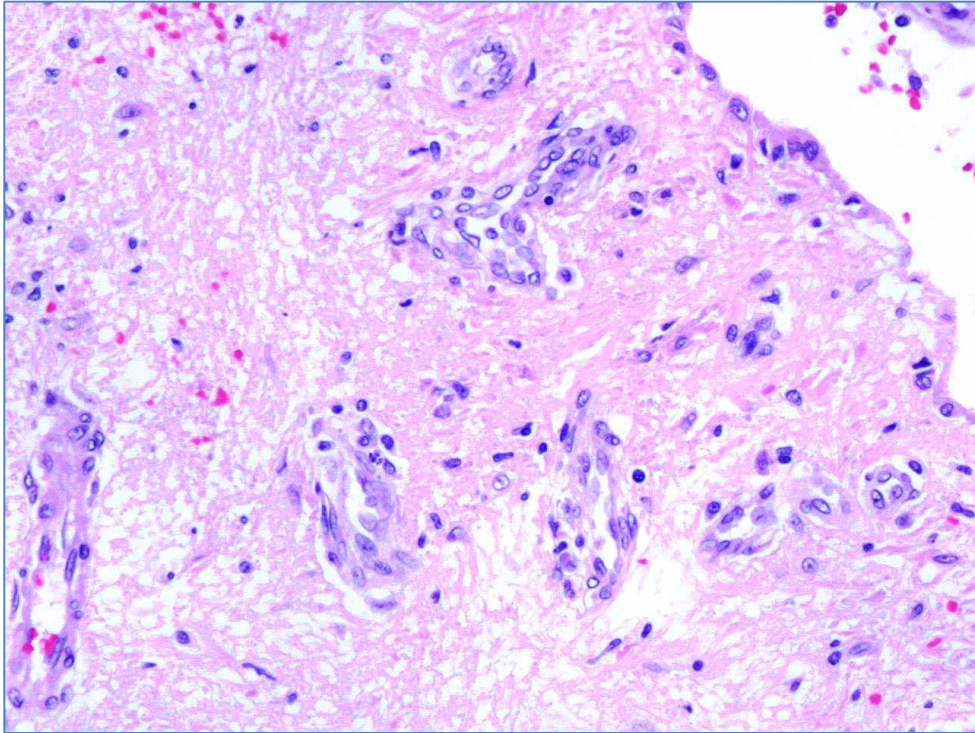


Figure 7: Proliferazione microvascolare di tipo semplice ipervascolare, 20x, EE.

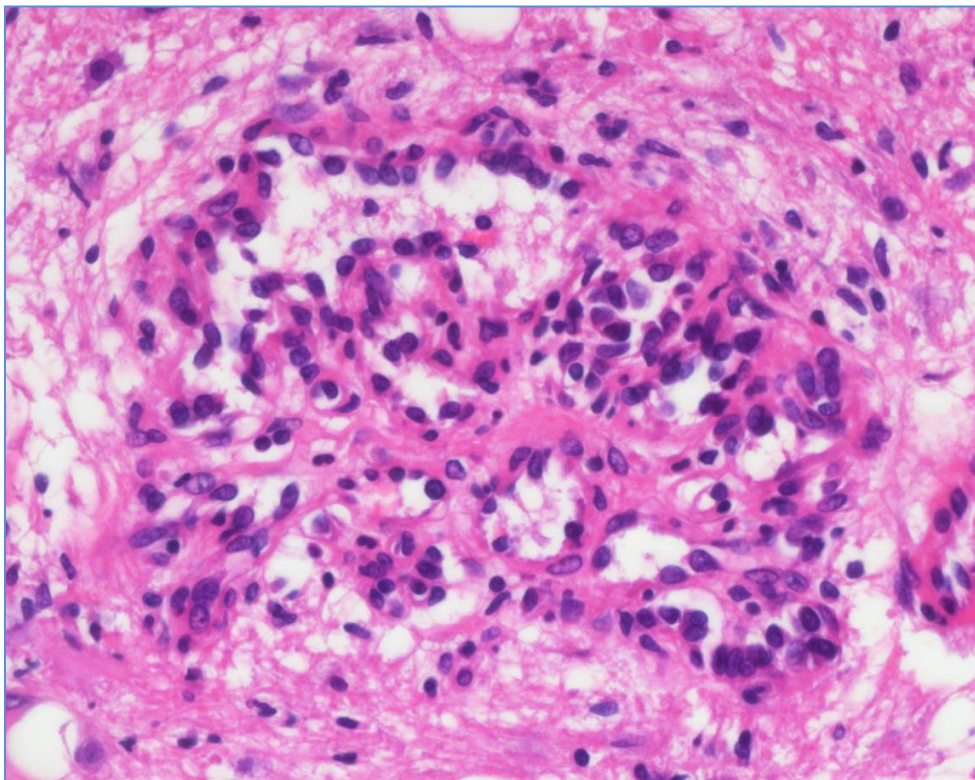


Figura 8: Proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide, 40x, EE.

I canali vascolari multipli erano delineati da un monostrato di cellule endoteliali appiattite, solo occasionalmente evidenti. I corpi glomeruloidi occorreivano in un solo papilloma su 23 (4%), e in 12/31 carcinomi (39%). Su un totale di 54 tumori, 19 non avevano la proliferazione microvascolare, di cui 11 erano papillomi e 8 carcinomi. Dunque, la presenza dei corpi glomeruloidi era significativamente ($p=0,0140$ Chi Square test) associata con i carcinomi dei plessi coroidei, rispetto alla semplice ipervascolarità o l'assenza di proliferazione microvascolare, combinatamente (**Grafico 2**), o anche se comparata unicamente con l'assenza di proliferazione microvascolare ($p=0,0079$ Fisher's exact test). L'ipervascolarità semplice era rappresentata in entrambi i gruppi, più elevata nei carcinomi ma con una associazione non statisticamente significativa ($p=0,1492$ Fisher's exact test). Ogni caso che presentava la ipervascolarità semplice mostrava allo stesso tempo i corpi glomeruloidi. Entrambi i tipi di proliferazione microvascolare erano principalmente localizzati a livello sub-ependimale nel parenchima cerebrale adiacente alla neoplasia (**Fig. 9**) o erano solo occasionalmente presenti all'interno dell'asse stromale delle papille tumorali. In alcuni casi (5/54) la proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide era localizzata a livello sub-ependimale in siti distanti rispetto al sito ventricolare primario, andando in alcuni di essi a delineare il completo sistema ventricolare. Le cellule ependimali in prossimità della proliferazione microvascolare erano atrofiche, con assenza delle ciglia.

Le caratteristiche istologiche e la prevalenza della proliferazione microvascolare nei CPT è riassunta in **Tabella 4**.

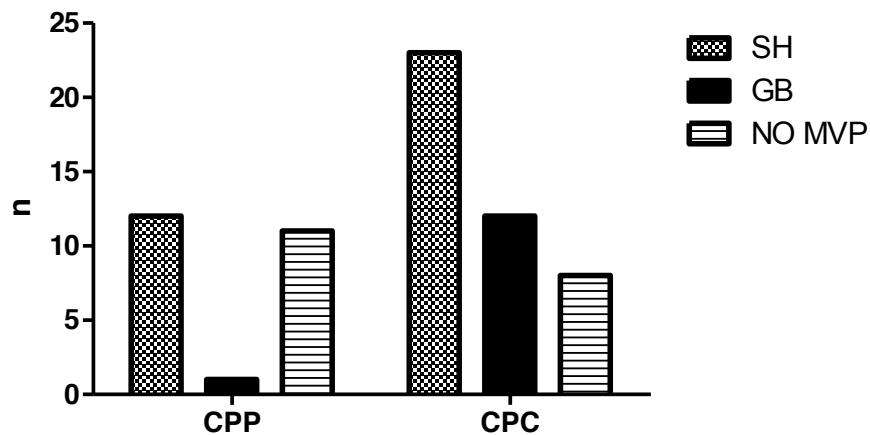


Grafico 2: Correlazione tra il grado e la proliferazione microvascolare: CPP: papilloma; CPC: carcinoma; SH: semplice ipervascolarità; GB: corpi glomeruloidi; NO MVP: assenza di proliferazione microvascolare. Notare la prevalenza dei corpi glomeruloidi nei carcinomi ($p=0,0140$ Chi Square test).

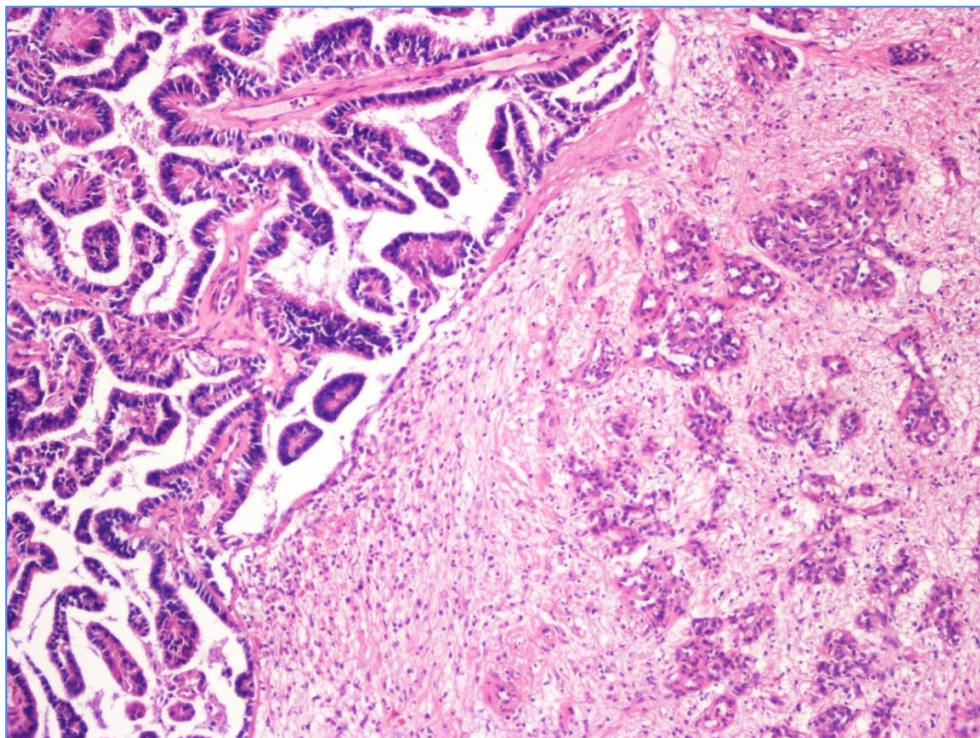


Figura 9: Proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide localizzata a livello sub-ependimale nel parenchima cerebrale adiacente alla neoplasia, 4x, EE.

Tabella 4: Caratteristiche istologiche e frequenza della proliferazione microvascolare dei tumori dei plessi coroidei del cane.

	CPT		CPP		CPC	
	n	%	N	%	n	%
Invasione cerebrale	24/49*	49%	4/23	22%	20/26	77%
Indice mitotico <2	36/54	67%	22/23	96%	14/31	45%
Indice mitotico >2	11/54	20%	1/23	4%	10/31	32%
Indice mitotico >5	7/54	13%	0/23	0%	7/31	23%
Aumento della cellularità	43/54	80%	13/23	57%	30/31	97%
Atipie nucleari	23/54	43%	1/23	4%	22/31	71%
Assenza del pattern papillare <50%	35/54	65%	8/23	35%	27/31	87%
Assenza del pattern papillare >50%	1/54	2%	0/23	0%	1/31	3%
Epitelio multistrato	34/54	63%	5/23	22%	29/31	94%
Necrosi	26/54	48%	7/23	30%	19/31	61%
Metastasi intraventricolari	6/50	12%	1/23	4%	7/26	27%
Metastasi subaracnoidee	7/54	13%	0/23	0%	7/31	23%
Desmoplasia	22/54	41%	2/23	9%	20/31	65%
Corpi glomeruloidi	13/54	24%	1/23	4%	12/31	39%
Ipervascularità semplice	35/54	65%	12/23	52%	23/31	74%
Proliferazione microvascolare	35/54	65%	12/23	52%	23/31	74%
No proliferazione microvascolare	19/54	35%	11/23	48%	8/31	26%

I tumori dei plessi coroidei con proliferazione microvascolare glomeruloide, avevano una quantità di necrosi significativamente ($p= 0,0256$) più alta rispetto ai tumori senza i corpi glomeruloidi (**Grafico 3**). La necrosi era ristretta all'interno del tumore e non era presente alcuna co-localizzazione con la proliferazione microvascolare glomeruloide. Per contro i tumori con la semplice ipervascolarità non mostravano nessuna associazione con la necrosi ($p=0,1935$).

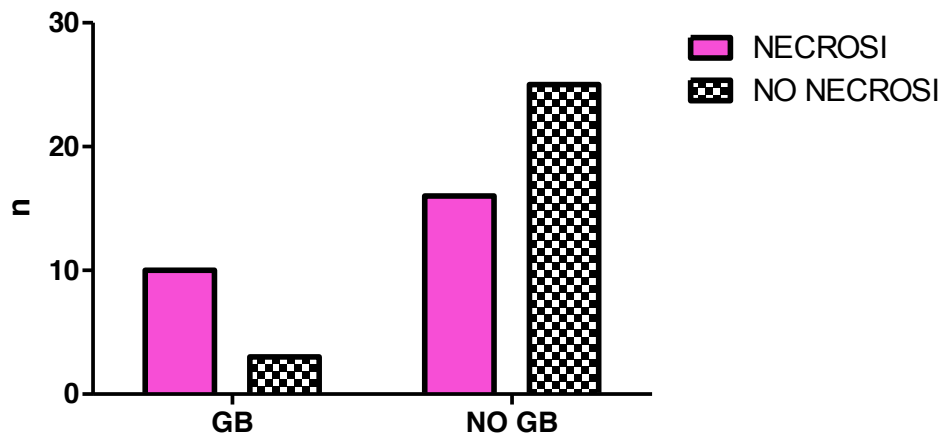


Grafico 3: Correlazione tra i tumori con o senza proliferazione microvascolare glomeruloide (GB: corpi glomeruloidi) e presenza/assenza di necrosi. I tumori con corpi glomeruloidi avevano una percentuale di necrosi significativamente più alta rispetto ai tumori con assenza di questa caratteristica istologica ($p= 0,0256$ Fisher's exact test).

Angiofenotipo

La semplice ipervascolarità e i corpi glomeruloidi erano entrambi composti da cellule murali fortemente positive ad α SMA (**Fig. 10**). Le cellule endoteliali che delineavano i canali vascolari erano fortemente positive a vWF nella semplice ipervascolarità, ma debolmente e non ovviamente

positive nei corpi glomeruloidi (**Fig. 11**). Le cellule murali nei corpi glomeruloidi erano la componente cellulare prevalente, se comparate con l'esiguo numero di cellule endoteliali.

Ki67 colorava i nuclei delle cellule endoteliali e delle cellule murali dei corpi glomeruloidi (**Fig. 12**) e della semplice ipervascolarità. I vasi normali solo raramente esprimevano Ki67.

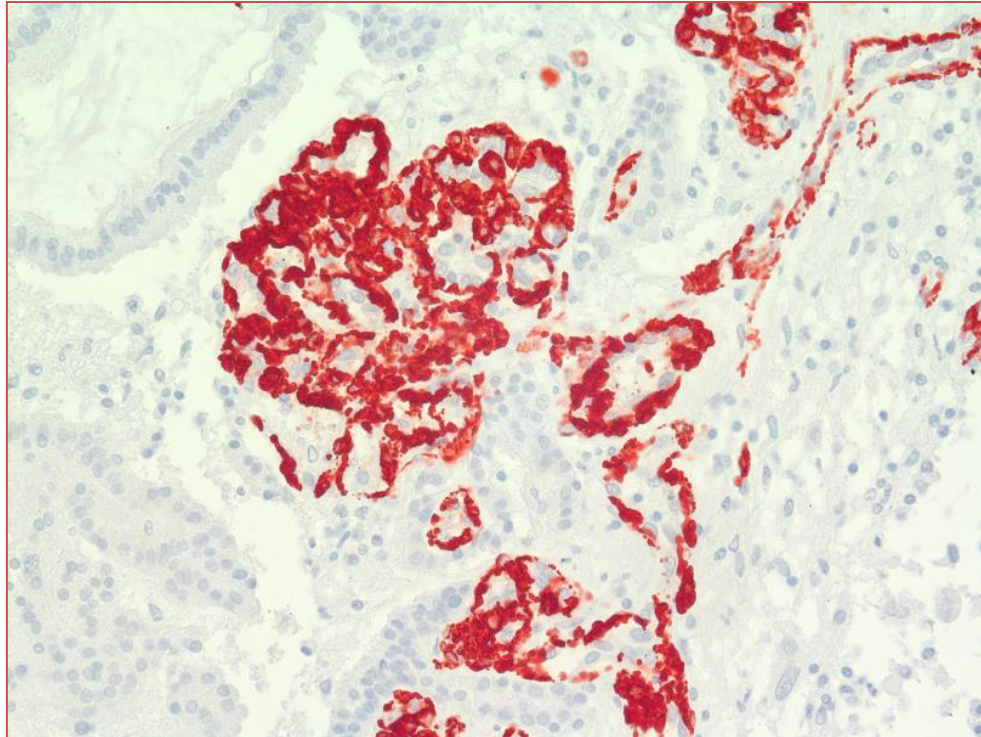


Figura 10: Corpi glomeruloidi con numerose cellule murali fortemente positive per α SMA, 20x, AEC.

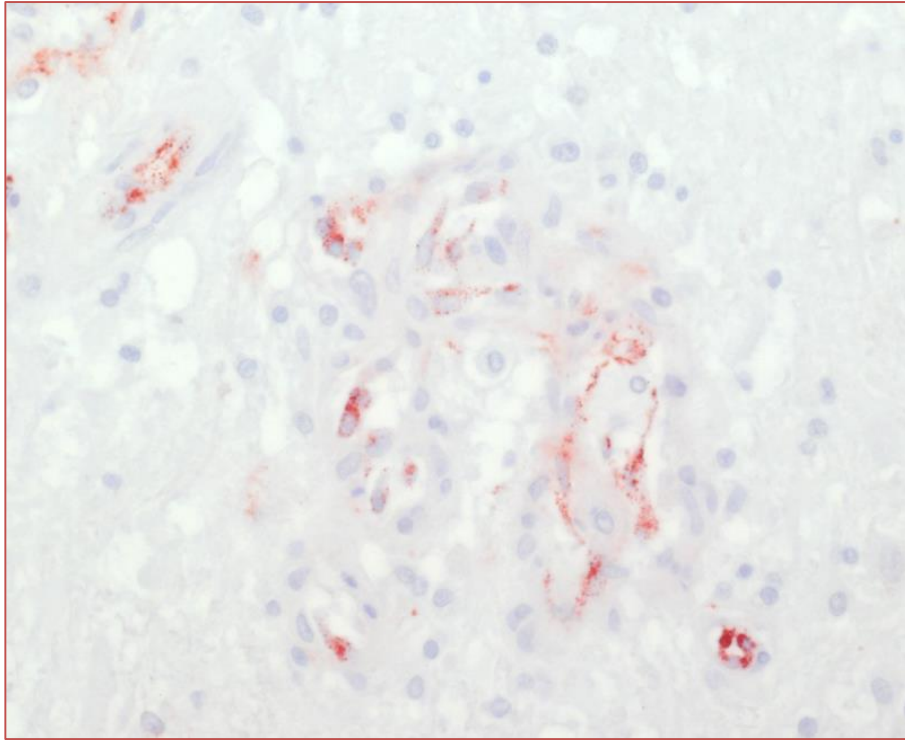


Figura 11: Corpo glomeruloide con un esiguo numero di cellule endoteliali debolmente reattive per vWF, 40x, AEC.

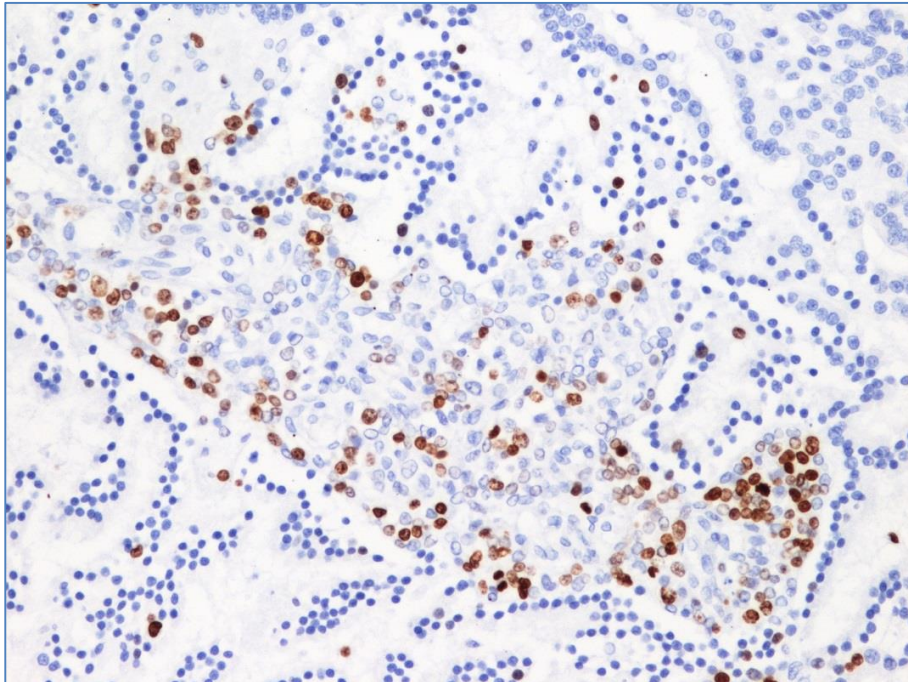


Figura 12: Proliferazione microvascolare glomeruloide immunoreattiva per Ki67, 20x, DAB.

Western Blot

VEGF, PDGF, PDGFR α and PDGFR β sono stati trovati a livello del loro peso molecolare atteso, verificando la cross-reattività per la specie canina. Per contro, nessuna banda è stata evidenziata per VEGFR1 e VEGFR2, pertanto esclusi dallo studio immunostochimico. VEGF è stato trovato in campioni di cervello, sia nella forma monomerica (24 kDa) che nella forma dimerica (42 kDa). PDGF è stato riscontrato in campioni di cervello, nella forma dimerica, con due bande a 31 e 42 kDa. PDGFR α è stato trovato nella forma monomerica (170 kDa) nei plessi coroidei normali. PDGFR β è stato riscontrato nei plessi coroidei normali e nel polmone, nella forma monomerica ad un peso molecolare di 190 kDa. Le bande aspecifiche sono state evidenziate grazie al controllo negativo.

Fattori di crescita e recettori tirosin chinasi nei tumori

PDGF, VEGF, PDGFR α e PDGFR β erano espressi nella maggior parte dei tumori dei plessi coroidei.

Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)

PDGF era diffusamente espresso nel citoplasma di tutti i controlli (6 di 6), ed era inoltre presente in 7 casi di plessi coroidei normali adiacenti alla neoplasia. PDGF era espresso in 24 di 24 tumori con due differenti pattern di colorazione: colorazione citoplasmatica diffusa granulare da lieve a moderata o aggregati cellulari multifocali con intensa colorazione citoplasmatica (**Fig. 13**). Il punteggio di colorazione era significativamente più basso nei carcinomi e nei papillomi rispetto ai plessi coroidei normali (Kruskal-Wallis test $p=0,0040$) (**Grafico 4**).

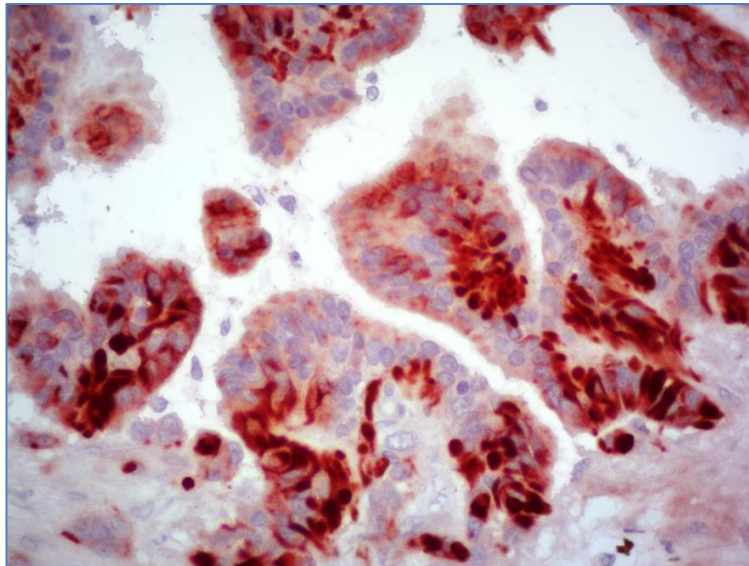


Figura 13: Espressione di PDGF forte e intensa nel citoplasma di un carcinoma, 40x, AEC.

Nessuna correlazione tra i gruppi di espressione (basso, intermedio, alto) e il grado è stata evidenziata (test di Spearman $R=0.486480$)

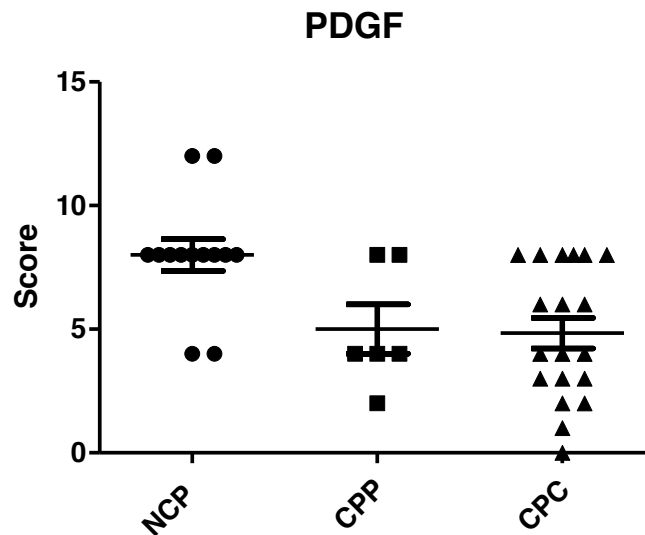


Grafico 4: punteggio di espressione di PDGF nei plessi normali (NCP), nei papillomi (CPP) e nei carcinomi (CPC). L'espressione si riduce significativamente nei tumori rispetto ai NCP ($p=0,0040$).

Recettore alfa del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR α)

PDGFR α era espresso in tutti i controlli (6 di 6), ed era inoltre presente in 7 casi con plessi coroidi normali adiacenti alla neoplasia. L'espressione era membranosa in 2/10 controlli e citoplasmatica in 7/10 controlli. La maggior parte dei CPT (24/25) esprimeva PDGFR α . I papillomi presentavano espressione membranosa in 2/6 casi (33%) ed espressione citoplasmatica in 4/6 (67%). I carcinomi avevano espressione membranosa (**Fig. 14**) in 10/18 casi (56%) ed espressione citoplasmatica in 8/18 (44%). Il punteggio di espressione di PDGFR α era lievemente aumentato nei carcinomi e nei

papillomi se comparato con i plessi coroidei normali, ma senza un'associazione significativa (Kruskal-Wallis test $p=0,8426$). PDGFR α aveva un punteggio di espressione elevato (9-12), nei papillomi e nei carcinomi (**Grafico 5**), assente nei plessi normali, sebbene non fosse presente una correlazione significativa (test di Spearman $R= 0, 248$ $p= 0,149$).

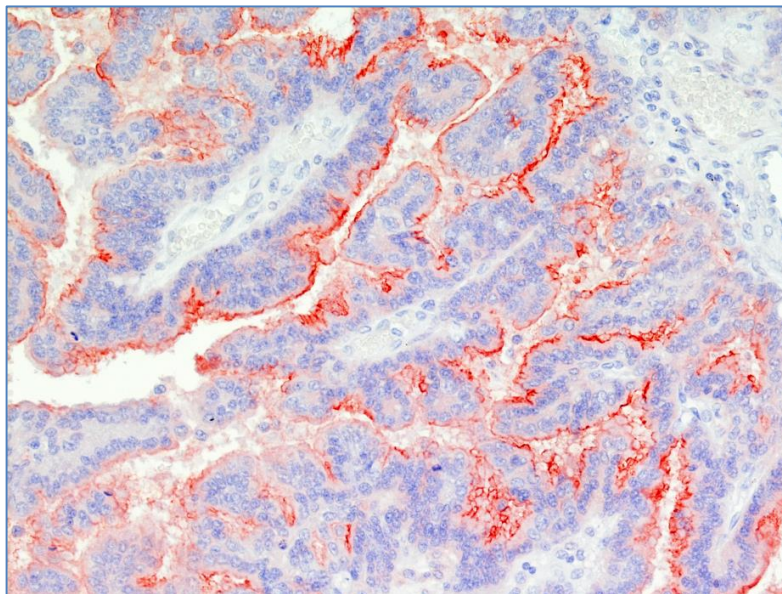


Figura 14: Espressione membranosa di PDGFR α in un carcinoma, 20x, AEC.

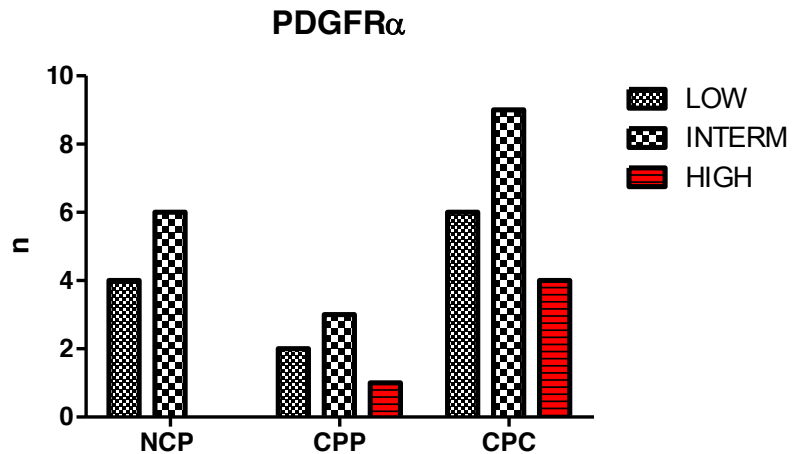


Grafico 5: Score di espressione di PDGFR α basso (0-4), intermedio (5-8), alto (9-12) in plessi coroidei normali (NCP), papillomi (CPP) e carcinomi (CPC). In rosso espressione alta nei carcinomi e nei papillomi, assente nei plessi normali.

Recettore beta del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR β)

PDGFR β era espresso in 4/6 controlli, ed era inoltre presente in 4 casi con plessi coroidei normali adiacenti alla neoplasia. L'espressione era membranosa in 7/8 controlli e citoplasmatica in un solo controllo. Ventuno di 25 CPT esprimevano PDGFR β . I papillomi presentavano espressione membranosa in 3/4 casi (75%) ed espressione citoplasmatica in 1/4 (25%). I carcinomi avevano espressione membranosa (**Fig. 15**) in 15/17 casi (88%) ed espressione citoplasmatica in 2/17 (12%). Il punteggio di espressione di PDGFR β era lievemente aumentato nei carcinomi e nei papillomi se comparato con i plessi coroidei normali, ma senza un'associazione significativa (Kruskal-Wallis test $p = 0,2944$). Solo i carcinomi avevano un

punteggio alto, che invece era assente in plessi normali e papillomi (**Grafico 6**) sebbene non fosse presente una correlazione statisticamente significativa (test di Spearman $R=0,248$ $p=0,149$).

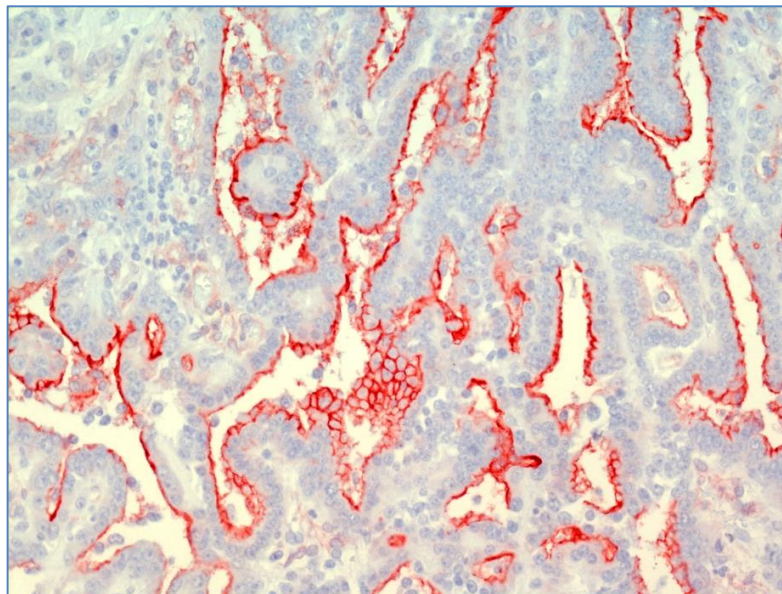


Figura 15: Espressione membranosa intensa del PDGFR β in un carcinoma, 20x, AEC.

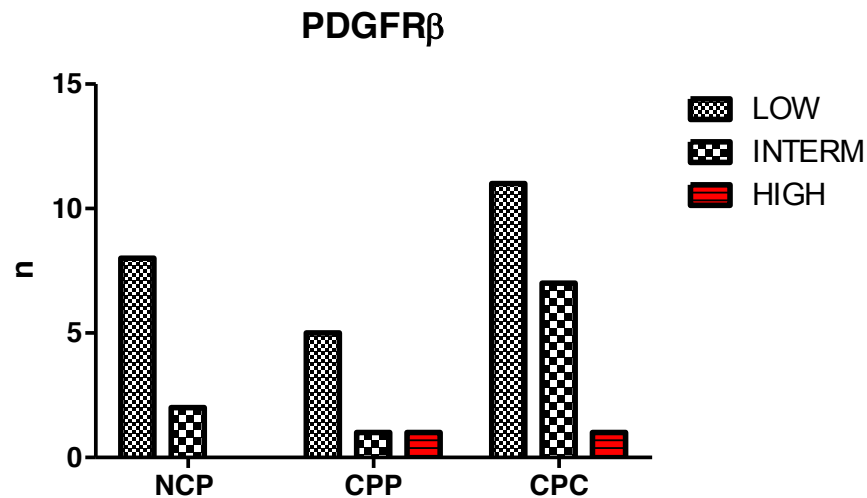


Grafico 6: Score di espressione di PDGFR β basso (0-4), intermedio (5-8), alto (9-12) in plessi coroidei normali (NCP), papillomi (CPP) e carcinomi (CPC). In rosso espressione alta nei carcinomi, assente nei papillomi e nei plessi normali.

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

VEGF era espresso intensamente nel citoplasma di tutti i plessi coroidei normali (6/6), e in 4 plessi coroidei normali localizzati in prossimità della neoplasia. VEGF era moderatamente presente nel citoplasma (**Fig. 16**) di 24/25 CPT. Il punteggio di espressione di VEGF era significativamente ridotto nei carcinomi e nei papillomi se comparato con i plessi coroidei normali (**Grafico 7**) (Kruskal-Wallis test $p=0,0008$). VEGF aveva un punteggio di espressione elevato (9-12), nei plessi coroidei normali con una correlazione significativa (test di Spearman $R=0,561183$ $p=0,0004$). Non è stata individuata alcuna co-localizzazione dell'espressione di VEGF da

parte delle cellule neoplastiche e la presenza di necrosi (Kruskal-Wallis test $p=0,1966$) (**Grafico 8**).

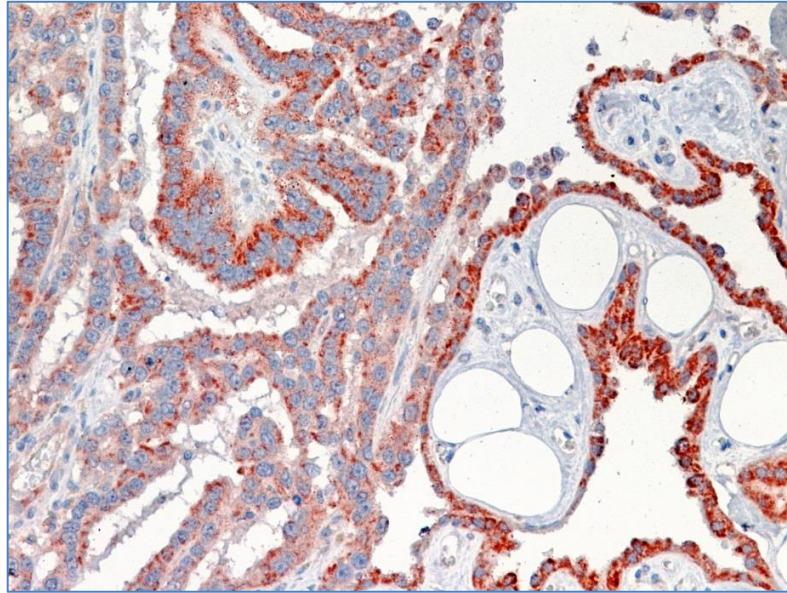


Figure 16: espressione citoplasmatica di VEGF, moderata nel carcinoma (sinistra), intensa nei plessi normali (a destra), 20x, AEC.

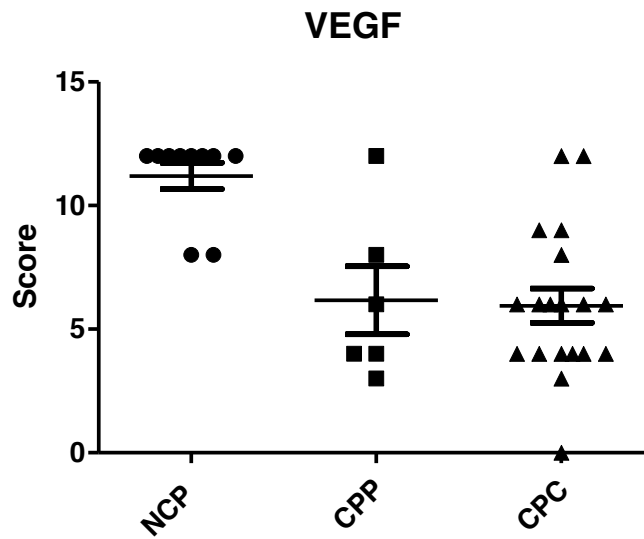


Grafico 7: punteggio di espressione di VEGF nei plessi normali (NCP), nei papillomi (CPP) e nei carcinomi (CPC). L'espressione si riduce significativamente nei tumori rispetto ai NCP (Kruskal-Wallis test $p=0,1966$).

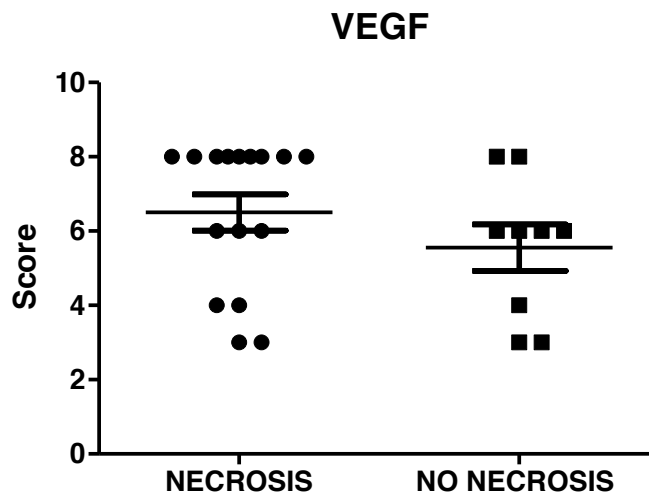


Grafico 8: Punteggio di espressione di VEGF in tumori con presenza e assenza di necrosi. Nessuna evidenza di associazione ($p=0,1966$).

I valori mediani del punteggio di espressione dei fattori di crescita e recettori tirosin chinasi nei plessi coroidei normali, nei papillomi e nei carcinomi sono riassunti in **Tabella 5**.

Non è stata trovata nessuna associazione tra l'espressione di fattori dell'angiogenesi né con l'indice di proliferazione Ki67, né con le dimensioni della neoplasia.

Tabella 5: Punteggio (score) di espressione mediano dei fattori di crescita e recettori nei plessi normali (NCP), nei papillomi (CPP) e nei carcinomi (CPC).

	Score NCP (mediana)	Score CPP (mediana)	Score CPC (mediana)
PDGF	8	4	4
PDGFRα	8	7	8
PDGFRβ	3,5	3,5	4
VEGF	12	5	6

Fattori di crescita e recettori tirosin chinasi nella proliferazione microvascolare

Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)

PDGF era espresso dalla maggior parte dei vasi normali (80%) a livello endoteliale e pericitario con intensità da debole a moderata. Per contro, la proliferazione microvascolare generalmente non esprimeva PDGF (negativa in 23/25 casi; 92%). Solo in due casi era presente una colorazione citoplasmatica debole e inconsistente a livello dei periciti e delle cellule muscolari lisce della proliferazione microvascolare. Pertanto, l'espressione

di PDGF, era significativamente più bassa nella proliferazione microvascolare rispetto ai vasi normali (**Grafico 9**) (Mann Whitney test $P < 0.0001$).

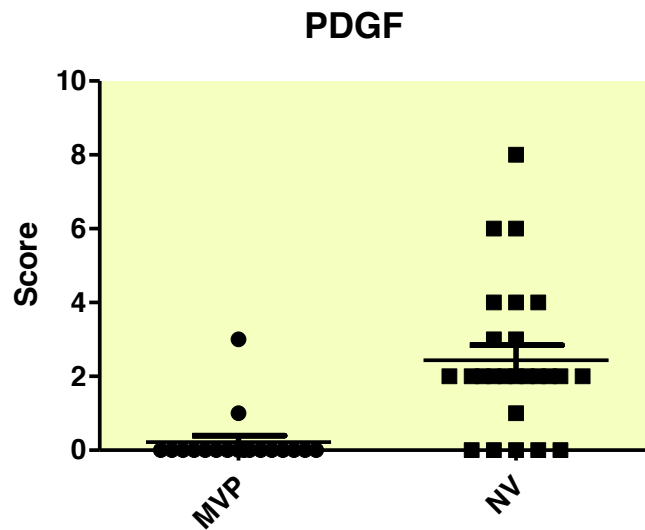


Grafico 9: Punteggio di espressione di PDGF nella proliferazione microvascolare (MVP) e nei vasi normali (NV), notare la più alta espressione nei NV rispetto alla MVP.

Recettore alfa del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR α)

Endotelio e periciti dei vasi cerebrali normali esprimevano PDGFR α in 24/25 casi. Endotelio e periciti della proliferazione microvascolare esprimevano debolmente PDGFR α solo in 11/18 casi. Il punteggio di espressione era significativamente più basso nella proliferazione microvascolare rispetto ai vasi normali (**Grafico 10**) (Mann Whitney test p=0,0011).

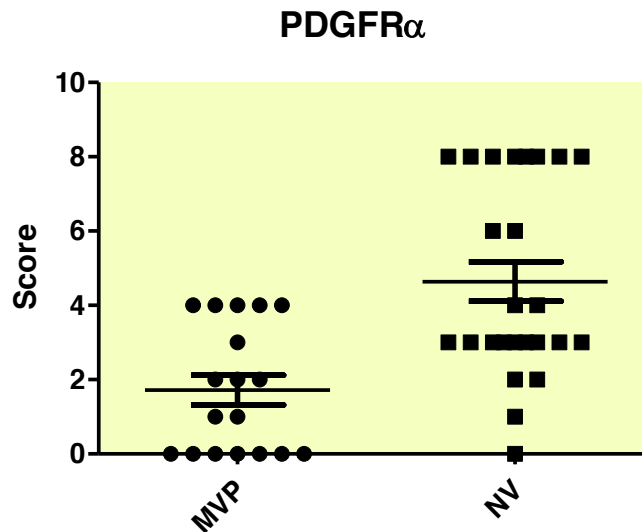


Grafico 10: Punteggio di espressione di PDGFR α nella proliferazione microvascolare (MVP) e nei vasi normali (NV), notare la più alta espressione nei NV rispetto alla MVP.

Recettore beta del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFRβ)

PDGFRβ era espresso da endotelio e periciti dei vasi normali del cervello in 14/25 casi (56%), con una punteggi di colorazione (**Grafico 11**) sostanzialmente più debole rispetto alla proliferazione microvascolare (Mann Whitney test $p=0,0131$). In questa, PDGFRβ era espresso in 16/18 CPT (89%), prevalentemente a livello di cellule murali, e occasionalmente da cellule endoteliali.

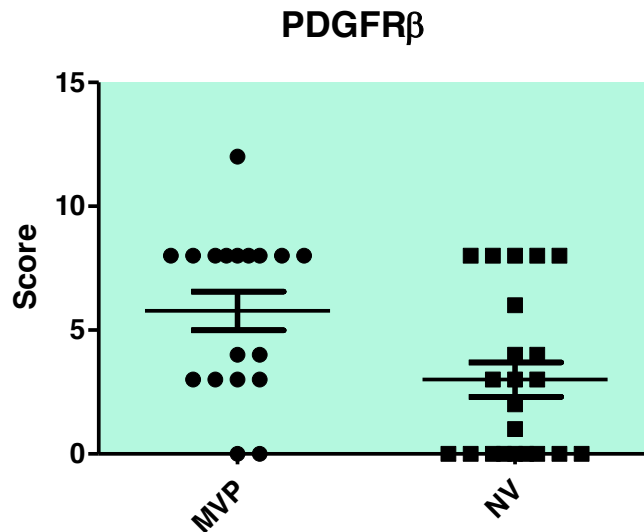


Grafico11: Punteggio di colorazione di PDGFRβ significativamente più alto nella proliferazione microvascolare (MVP) rispetto ai vasi normali (NV) ($p=0,0113$).

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

In tutti i casi esaminati (25/25) i vasi cerebrali avevano un'espressione endoteliale di VEGF, con un punteggio di colorazione (**Grafico 12**) significativamente più alto rispetto alla proliferazione microvascolare (Mann Whitney test $p=0,0015$). In questa, VEGF era espresso dall'endotelio e occasionalmente dalle cellule murali di 17/18 CPT.

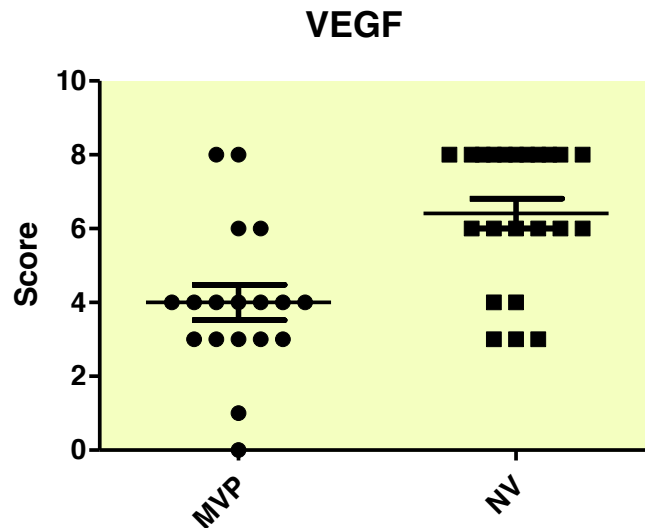


Grafico 12: Punteggio di espressione di VEGF più basso nella proliferazione microvascolare (MVP) rispetto ai vasi normali (NV) ($p= 0,0015$)

I valori mediani del punteggio di espressione dei fattori di crescita e recettori tirosin chinasi nella proliferazione microvascolare e nei vasi normali sono riassunti in **Tabella 6**.

	MVP (mediana)	NV (mediana)
PDGF	0	2
PDGFRα	1,5	3
PDGFRβ	8	2,5
VEGF	4	7

Tabella 6: Punteggio di espressione mediano dei fattori di crescita e recettori tirosin chinasi nella proliferazione microvascolare (MVP) e nei vasi normali (NV).

3.1.4. Discussione

I tumori dei plessi coroidei sono rare neoplasie intraventricolari, frequentemente localizzate nel cane a livello del IV ventricolo (Westworth *et al.*, 2008; Nentwig *et al.*, 2012). In base alle somiglianze istologiche osservate con i tumori dei plessi coroidei dell'uomo, nel cane è correntemente applicato il sistema di classificazione e grading WHO umano (Louis *et al.*, 2007; Westworth *et al.*, 2008). I nostri risultati riguardo l'indice di proliferazione Ki67 correlavano significativamente con il grado, indicativo di una più alta attività proliferativa nei carcinomi. Questi risultati sono in linea su quanto riportato nei tumori dei plessi coroidei dell'uomo, in cui è descritto un progressivo aumento dell'indice di proliferazione dai plessi coroidei normali ai carcinomi (Rickert *et al.*, 2001; Carlotti *et al.*, 2002; Wrede *et al.*, 2009). Nell'uomo l'indice di proliferazione è considerato un

importante indice prognostico, associato all'aggressività del tumore, al decorso clinico e terapeutico (Sun *et al.*, 2014). I nostri dati suggeriscono che il Ki67 potrebbe essere un promettente marcatore in grado di stimare il comportamento biologico dei tumori dei plessi coroidei del cane, ma sono necessari studi prospettici in grado di validare il valore predittivo del comportamento biologico del grado WHO umano nei tumori del cane.

La vascolarizzazione tumorale è fondamentale per la crescita e la diffusione metastatica delle neoplasie (Kumar *et al.*, 2015). La proliferazione microvascolare è una caratteristica istopatologica degli astrocitomi di grado IV (glioblastoma) e degli oligodendrogliomi di alto grado nell'uomo (Louis *et al.*, 2007) e nel cane (Lipsitz *et al.*, 2006). La proliferazione microvascolare glomeruloide è associata con un comportamento biologico tumorale aggressivo, una ridotta sopravvivenza, e un aumento dei tassi di recidiva in melanomi, carcinomi mammari, prostatici ed endometriali (Straume *et al.*, 2002). Inoltre, la proliferazione microvascolare glomeruloide è correlata con una mancanza di risposta alla chemioterapia nel carcinoma mammario (Akshen *et al.*, 2011). Nel nostro lavoro i corpi glomeruloidi sono significativamente e chiaramente prevalenti nei carcinomi ($p=0,0140$), suggestivo che i corpi glomeruloidi possono essere utilizzati come marcatori istologici di malignità nei tumori dei plessi coroidei del cane. Il meccanismo patogenetico sottostante la genesi dei corpi glomeruloidi è materia di dibattito. I corpi glomeruloidi probabilmente originano mediante un meccanismo di captazione dei vasi pre-esistenti (vessel co-option) (Brat *et*

al., 2001; Dome *et al.*, 2003). In un modello murino, la proliferazione microvascolare è indotta dal VEGF, mediante un meccanismo di “sprouting angiogenesis”, che porta alla formazione di corpi glomeruloidi composti da un vaso madre circondato da numerose cellule endoteliali altamente proliferative e da un ridotto numero di periciti (Sundberg *et al.*, 2001). In un altro studio, in cui sono state indotte sperimentalmente metastasi cerebrali in un modello murino, i corpi glomeruloidi originano effettuando una trazione sui vasi pre-esistenti e portando ad un processo di rimodellamento degli stessi, formando una rete capillare ripiegata caotica ed aggrovigliata, senza evidenza di attività di ramificazione ed angiogenesi (Dome *et al.*, 2003). Il meccanismo classico descritto per la formazione dei corpi glomeruloidi negli astrocitomi avviene attraverso la captazione dei vasi capillari pre-esistenti, che resistono alla captazione attraverso il rilascio di Angiostatina-2, che causa l’apoptosi delle cellule endoteliali (Brat *et al.*, 2001). Le cellule astrocitarie adiacenti vanno incontro a necrosi e creano il tipico pattern di necrosi a pseudo-palizzata. Le cellule neoplastiche in prossimità della necrosi vanno incontro ad ipossia e up-regolano l’espressione di VEGF, che stimola l’iperplasia vascolare tra cui la proliferazione glomeruloide (Brat *et al.*, 2001). Nei casi da noi osservati, i tumori con proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide, erano più frequentemente associati alla presenza di necrosi, rispetto ai tumori senza corpi glomeruloidi ($p=0,0256$). Comunque non era presente una co-localizzazione spaziale della necrosi e della proliferazione microvascolare, e a differenza dei gliomi, nei nostri casi

sembra che questi due eventi occorrano indipendentemente l'uno dall'altro. Questa caratteristica è avvalorata dalla conformazione anatomica dei corpi glomeruloidi, che sono strutturalmente caratterizzati da un ridotto numero di cellule endoteliali, debolmente positive al vWF, suggestivo di una proliferazione endoteliale non dipendente da VEGF. Questi dati sono indicativi del fatto che la formazione della proliferazione glomeruloide nei tumori dei plessi coroidei del cane è guidata da un meccanismo differente rispetto a quello dei gliomi. Nell'uomo, analogamente, la formazione dei corpi glomeruloidi nei melanomi, carcinomi endometriali (Straume *et al.*, 2002) e nei tumori polmonari non a piccole cellule è indipendente dall'espressione di VEGF (Tanaka *et al.*, 2003). La proliferazione microvascolare era principalmente localizzata a livello sub-ependimale nel parenchima cerebrale. La localizzazione sub-ependimale suggerisce una possibile permeabilità dei fattori di crescita presenti nel liquido cefalorachidiano, ma sono necessari ulteriori studi per confermare questa ipotesi.

L'espressione di α SMA e PDGFR β indicano che i corpi glomeruloidi nei tumori dei plessi coroidei del cane, sono principalmente composti da periciti reattivi (Armulik *et al.*, 2011). Generalmente i periciti quiescenti, nel sistema nervoso centrale non esprimono α SMA, che viene espressa solo in condizioni patologiche come l'angiogenesi tumorale, la fibrosi tissutale e l'infiammazione (Armulik *et al.*, 2011). Il PDGFR β è considerato un marcatore specifico per i periciti cerebrali (Armulik *et al.*, 2011). I corpi glomeruli nella

nostra casistica erano costituiti da un basso numero di cellule endoteliali, con un rapporto cellule endoteliali : periciti sbilanciato, suggestivo di un'abbondanza pericitaria (Armulik *et al.*, 2011). I periciti iperplastici sono stati descritti come componente principale nella proliferazione microvascolare glomeruloide nei gliomi umani ad alto grado (Sun *et al.*, 2014). Una via di segnale che opera nella comunicazione tra cellule endoteliali e periciti è quella del PDGF/PDGFRs (Ribatti *et al.*, 2011). Normalmente durante l'angiogenesi il PDGF è prodotto dalle cellule endoteliali e attiva il recettore beta espresso dai periciti, indicativo di un tipo di comunicazione paracrina tra questi due tipi cellulari (Ribatti *et al.*, 2011; Armulik *et al.*, 2005; Armulik *et al.*, 2011). Il PDGF promuove dunque il reclutamento e la proliferazione dei precursori dei periciti (Ribatti *et al.*, 2011). Nella nostra casistica il PDGF era quasi del tutto assente nella proliferazione microvascolare, ma era espresso dalle cellule neoplastiche, rappresentando potenzialmente una risorsa che può agire sui periciti della proliferazione microvascolare esprimenti il recettore beta.

Oltre ad essere coinvolto nell'angiogenesi tumorale e nel reclutamento dello stroma tumorale, la via PDGF/PDGFR è stata descritta inoltre per la stimolazione autocrina delle cellule neoplastiche (Nupponen *et al.*, 2008).

PDGF e VEGF erano espressi dalla maggior parte dei tumori, sebbene con una riduzione rispetto ai plessi normali. Questi risultati possono essere giustificati con la conformazione anatomica e funzionale dei plessi coroidei normali. I plessi coroidei sono strutture papillari composte da cellule

epiteliali cuboidali endoteliali modificate, che rivestono un asse stromale con endotelio fenestrato (Markland *et al.*, 2010; Maharaj *et al.*, 2006). Al fine di mantenere la fenestrazione i plessi coroidei presentano un fenotipo “angiogenico”, mostrando dunque elevati livelli di fattori pro-angiogenici come il VEGF (Maharaj *et al.*, 2006; Maharaj *et al.*, 2008). Il blocco di VEGF, insieme al blocco del TGF- β (Transforming growth factor beta), induce l’assenza delle fenestrature e l’ispessimento dell’endotelio capillare, con perdita dei microvilli e lo sviluppo di edema peri-ventricolare (Maharaj *et al.*, 2008). Dunque, non è sorprendente trovare una riduzione dei fattori di crescita nei tumori rispetto ai plessi normali, ulteriormente aggravata dalla dedifferenziazione cellulare che occorre nelle neoplasie. Una elevata espressione di PDGFR α è stata riscontrata nei carcinomi rispetto ai plessi coroidei normali, sebbene in assenza di un’associazione statisticamente significativa ($p=0,8426$). Il più alto punteggio di espressione di PDGFR β è stato riscontrato unicamente nei carcinomi, senza però un’associazione statisticamente significativa ($p=0,2944$). I recettori α e β di PDGF sono espressi nei papillomi, nei papillomi atipici e nei carcinomi dei plessi coroidei dell’uomo (Nupponen *et al.*, 2008), ma la fosforilazione del recettore β è significativamente aumentata nei carcinomi rispetto ai papillomi (Koos *et al.*, 2009; Safaee *et al.*, 2013). La sovraespressione del recettore β è inoltre correlata con lo stato di amplificazione del gene *PDGFRB*. Nel presente studio è stata riscontrata una concomitante espressione di PDGF e di suoi recettori tirosin chinasi nei tumori dei plessi coroidei. La sovraespressione

dei recettori di PDGF, è associata con una ridotta sopravvivenza, una maggiore progressione tumorale e diffusione metastatica in una serie di tumori umani (Raica e Cimpean, 2010). L'impossibilità di una resezione chirurgica totale unitamente all'assenza di un protocollo chemioterapico unitario (Sun *et al.*, 2014), fa sì che l'identificazione dei recettori tirosin chinasi sia una promettente possibilità terapeutica nel trattamento dei tumori dei plessi coroidei dei bambini (Nupponen *et al.*, 2008). L'utilizzo di inibitori tirosin chinasi (imatinib mesylate) nell'uomo ha raggiunto successi terapeutici nel dermatofibroma protuberans, nel glioblastoma, nei carcinomi prostatici ed ovarici (Raica e Cimpean, 2010). L'inibizione dei recettori di PDGF è mirata non solo verso le cellule tumorali ma anche verso le cellule endoteliali, inducendo un aumento combinato dell'indice apoptotico del tumore ed una ridotta densità microvascolare (Raica e Cimpean, 2010).

2.1.5. Conclusione

In conclusione il grado istologico dei tumori dei plessi coroidei, con particolare riferimento ai carcinomi, correla significativamente con l'indice di proliferazione e con la proliferazione microvascolare di tipo glomeruloide. Mentre nessuna associazione è stata riscontrata tra semplice ipervascolarità e grado tumorale. Ovviamente, è necessario che questi dati vengano confermati da studi prospettici, dato che non è chiaro quanto il sistema classificativo umano rifletta realmente il comportamento biologico dei tumori dei plessi coroidei del cane. La via PDGF/PDGFRs nei tumori dei plessi coroidei del cane, si pensa possa essere coinvolta nel reclutamento

dei periciti e nella formazione dei corpi glomeruloidi. Nell'uomo non è ancora chiaro se la proliferazione glomeruloide sia una forma accelerata di angiogenesi, o una forma disfunzionale abortiva (Dome *et al.*, 2007). I nostri risultati suggeriscono che lo "switch" angiogenico sia guidato da una non regolata ed aberrante via di PDGF, coinvolta nella formazione dei corpi glomeruloidi. I nostri dati forniscono le prime prove che la proliferazione microvascolare glomeruloide e l'indice di proliferazione possano servire come marcatori di malignità nei tumori dei plessi coroidei del cane.

3.1.6. Bibliografia

- Akslen LA, Straume O, Geisler S, Sørli T, Chi JT, Aas T, Børresen-Dale AL, Lønning PE. Glomeruloid microvascular proliferation is associated with lack of response to chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):9-12.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 2005 Sep 16;97(6):512-23.
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011 Aug 16;21(2):193-215.
- Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):789-96.

- Brem S., Cotran R. and Folkman J. (1972). Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 347-356.
- Cantile and Youssef, *Nervous System*, in: Jubb, Kennedy and Palmer's *Pathology of domestic animals*, 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2016, page 398.
- Carlotti CG Jr, Salhia B, Weitzman S, Greenberg M, Dirks PB, Mason W, Becker LE, Rutka JT. Evaluation of proliferative index and cell cycle protein expression in choroid plexus tumors in children. *Acta Neuropathol.* 2002 Jan;103(1):1-10.
- Döme B, Tímár J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Jun;62(6):655-61.
- Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):1-15.
- Gavin P. Dunn, Mikael L. Rinne, Jill Wykosky, Giannicola Genovese, Steven N. Quayle, Ian F. Dunn, Pankaj K. Agarwalla, Milan G. Chheda, Benito Campos, Alan Wang, Cameron Brennan, Keith L. Ligon, Frank Furnari, Webster K. Cavenee, Ronald A. Depinho, Lynda Chin, William C. Hahn Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma *Genes Dev.* 2012 April 15; 26(8): 756–784.

- Gerhardt H, Semb H. Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J Mol Med*. 2008 Feb;86(2):135-44.
- Giannuzzi AP, Gernone F, Ricciardi M, De Simone A, Mandara MT. A sacro-caudal spinal cord choroid plexus papilloma in a shar-pei dog. *J Small Anim Pract*. 2013 Oct;54(10):551-4.
- Higgins RJ, Dickinson PJ, LeCouteur RA, Bollen AW, Wang H, Wang H, Corely LJ, Moore LM, Zang W, Fuller GN Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFRalpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J Neurooncol*. 2010 May;98(1):49-55
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Aug;8(8):610-22.
- Koos B, Paulsson J, Jarvius M, Sanchez BC, Wrede B, Mertsch S, Jeibmann A, Kruse A, Peters O, Wolff JE, Galla HJ, Söderberg O, Paulus W, Ostman A, Hasselblatt M. Platelet-derived growth factor receptor expression and activation in choroid plexus tumors. *Am J Pathol*. 2009 Oct;175(4):1631-7.
- Kumar V, Abbas AK, Aster. Neoplasia. In: *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, 9th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds), 2007, IARC, Lyon. WHO

- Lipsitz D, Higgins RJ, Kortz GD, Dickinson PJ, Bollen AW, Naydan DK, LeCouteur RA. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Vet Pathol.* 2003 Nov;40(6):659-69.
- Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. Classification of Tumours of the CNS. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):639-48.
- Markland (Editor), Francis S. Stephen Swenson (Editor), Radu Minea (Editor) ISBN: 978-3-527-32091-2351 pages. *Tumor Angiogenesis.* April 2010, Wiley-Blackwell.
- Nentwig A, Higgins RJ, Francey T, Doherr M, Zurbriggen A, Oevermann A. Aberrant E-cadherin, β -catenin, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in canine choroid plexus tumors. *J Vet Diagn Invest.* 2012 Jan;24(1):14-22.
- Nupponen NN, Paulsson J, Jeibmann A, Wrede B, Tanner M, Wolff JE, Paulus W, Ostman A, Hasselblatt M. Platelet-derived growth factor receptor expression and amplification in choroid plexus carcinomas. *Mod Pathol.* 2008 Mar;21(3):265-70.
- Ran Sophia, 2012, InTech. *Tumor Angiogenesis*, Chapter 13 Kelly Burrell and Gelareh Zadeh (2012). *Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis*, Dr. Sophia Ran (Ed.), ISBN: 978-953-51-0009-6.
- Raica Marius and Anca Maria Cimpean. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for

Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals* 2010, 3(3), 572-599.

- Ribas JL, Mena H, Braund KG, Sesterhenn IA, Toivio-Kinnucan M. A histologic and immunocytochemical study of choroid plexus tumors of the dog. *Vet Pathol.* 1989 Jan;26(1):55-64.
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011;55(3):261-8.
- Rickert CH, Paulus W. Tumors of the choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 2001 Jan 1;52(1):104-11.
- Safaee M, Oh MC, Bloch O, Sun MZ, Kaur G, Auguste KI, Tihan T, Parsa AT. Choroid plexus papillomas: advances in molecular biology and understanding of tumorigenesis. *Neuro Oncol.* 2013 Mar;15(3):255-67.
- Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Bégin LR, Foulkes WD, Akslen LA. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 2002 Dec 1;62(23):6808-11.
- Sun MZ, Oh MC, Ivan ME, Kaur G, Safaee M, Kim JM, Phillips JJ, Auguste KI, Parsa AT. Current management of choroid plexus carcinomas. *Neurosurg Rev.* 2014 Apr;37(2):179-92;
- Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. Glomeruloid

microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003 Oct 15;63(20):6791-4.

- Tena Suck ML (2015) CD34, EVFR, EVGR2 and Cd15 in Choroid Plexus Tumor; Clinical-Pathological and Immunohistochemical Approaches. *Ann Vasc Med Res* 2(2): 1015
- Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A, 2012, Wiley-Blackwell. *Veterinary neuropathology Essential of theory and practice.*
- Westworth DR, Dickinson PJ, Vernau W, Johnson EG, Bollen AW, Kass PH, Sturges BK, Vernau KM, Lecouteur RA, Higgins RJ. Choroid plexus tumors in 56 dogs (1985-2007). *J Vet Intern Med.* 2008 Sep-Oct;22(5):1157-65.
- Wrede B, Hasselblatt M, Peters O, Thall PF, Kutluk T, Moghrabi A, Mahajan A, Rutkowski S, Diez B, Wang X, Pietsch T, Kortmann RD, Paulus W, Jeibmann A, Wolff JE. Atypical choroid plexus papilloma: clinical experience in the CPT-SIOP-2000 study. *J Neurooncol.* 2009 Dec;95(3):383-92.
- Yang J, Dombrowski SM, Deshpande A, Krajcir N, Luciano MG. VEGF/VEGFR-2 changes in frontal cortex, choroid plexus, and CSF after chronic obstructive hydrocephalus. *J Neurol Sci.* 2010 Sep 15;296(1-2):39-46.

- Zecchin A, Borgers G, Carmeliet P. Endothelial cells and cancer cells: metabolic partners in crime? Curr Opin Hematol. 2015 May;22(3):234-42.

Questo studio è stata presentato al congresso ESVP 2015 ed ha ricevuto il premio per le migliori comunicazioni orali (**The European Society of Veterinary pathology award for the oral presentation ECVP ANNUAL MEETING 2-5 September 2015 Helsinki, Finland**).

4.

I FATTORI DI CRESCITA NELLA DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

I fattori di crescita sono fondamentali per la differenziazione cellulare. Da studi su cellule staminali pluripotenti umane è stato evidenziato che i fattori di crescita possono essere suddivisi in 3 grandi classi in grado di produrre un effetto di differenziazione e selezione cellulare (Schuldiner *et al.*, 2000):

- Fattori in grado di indurre una differenziazione mesodermica: Activina A e fattore di crescita trasformante-beta 1 (TGF- β 1).
- Fattori in grado di indurre una differenziazione sia mesodermica che ectodermica: acido retinoico, fattore di crescita epidermico (EGF), proteina morfogenica dell'osso (BMP-4), e fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF o FGF2)
- Fattori in grado di indurre una differenziazione verso tutti e tre i foglietti embrionali, incluso l'endoderma: fattori di crescita dei nervi (NGF) e fattore di crescita degli epatociti (HGF).

Durante l'embriogenesi e la crescita, numerosi fattori di crescita, intervengono nella differenziazione cellulare. Ad esempio nella differenziazione ossea sono fondamentali l'FGF, il TGF, e le BMP (Craig *et al.*, 2015). Una mutazione puntiforme del gene che codifica per il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti-3 (FGFR3) è responsabile di condrodiplosia su base genetica nelle pecore (Beever *et al.*, 2006; Craig *et al.*, 2015).

Bibliografia

- Beever JE, *et al.* A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Anim Genet* 2006;37:66-71.
- Craig, Dittmer and Thompson. Bones and joints. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11307-12.

4.1.

CONDRODISPLASIA BOVINA DI ELLIS VAN CREVELD

(Contributo Sperimentale)

La sindrome di Ellis-van Creveld (EVC) è una sindrome clinica complessa, primariamente descritta nei bambini, che si presenta con arti accorciati, ritardo nella crescita ossea, polidattilia post-assiale, difetti ectodermici e difetti cardiaci (Ellis *et al.*, 1940). Epidemiologicamente, questa sindrome è estremamente diffusa nella comunità Amish della contea di Lancaster (USA), a causa dell'endogamia (Mckusick *et al.*, 1964). In uno studio su 52 pazienti Amish, 30 soggetti sono morti sotto i 6 mesi di età a causa di questa sindrome (Mckusick *et al.*, 1964). La sindrome di Ellis-van Creveld è un disordine autosomico recessivo, causato da una mutazione del gene *EVC*, localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Takeda *et al.*, hanno mappato il locus responsabile di nanismo condrodisplasico in bovini di razza Bruna Giapponese in una regione ortologa al cromosoma umano 4p16 (Takeda *et al.*, 2002). Gli Autori, negli animali affetti da nanismo, hanno riscontrato due mutazioni in un gene contiguo al gene *EVC*, chiamato *LIMBIN* (Takeda *et al.*, 2002). Successivamente, in pazienti umani, sono state identificate mutazioni nell'ortologo umano di *LIMBIN*, denominato *EVC2*, responsabile di ulteriori fenotipi della sindrome clinica (Galdzicka *et al.*, 2002). L'assenza di mutazioni funzionali nelle proteine codificate dai geni *EVC* and *EVC2*, porta alla sindrome di Ellis van Creveld, un disordine recessivo. In contrasto, a

causa di mutazioni funzionali nella porzione terminale di una delle proteine codificate dai geni *EVC* and *EVC2*, porta alla sindrome di Weyers, un disordine autosomico dominante, a generalmente meno grave, con dominanza incompleta (Ruiz-Perez *et al.*, 2009). Questi disordini sono inclusi in un gruppo di malattie chiamate ciliopatie, caratterizzate da anomalie nelle cilia primarie. Mutazioni dei geni *EVC* ed *EVC2* può causare disfunzione ciliare, a ragion del fatto che questi geni sono coinvolti nello sviluppo delle cilia primarie (Kamal *et al.*, 2010). I geni *EVC* ed *EVC2* codificano per le proteine EVC e LIMBIN, rispettivamente, proteine transmembrana localizzate nei corpi basali delle cilia primarie (Kamal *et al.*, 2010). L'analisi di modelli murini con sindrome di Ellis-van Creveld ha dimostrato un segnale abnorme per le proteine Hedgehog (Ruiz-Perez *et al.*, 2007). Le Hedgehog (Hh) appartengono a una famiglia di peptidi secretori, aventi un ruolo importante nello sviluppo dei vertebrati, in quanto controllano numerose fasi della differenziazione cellulare. Difetti genetici e anomalie nel pathway delle Hh causa gravi anomalie scheletriche craniali, assili e appendicolari, nell'uomo e in altri vertebrati (Tavella *et al.*, 2004). Topi transgenici che sovraesprimono Sonic hedgehog (SHH) sono affetti da grave craniorachischisi e difetti ossei costali, sternali e a livello di ossa lunghe con disorganizzazione della cartilagine di accrescimento (Tavella *et al.*, 2004).

I condrociti nella cartilagine di accrescimento sono soggetti all'influenza di una miriade di fattori extracellulari, sia sistemici che fattori solubili locali,

così come componenti della matrice extracellulare (Little *et al.*, 2005). I principali componenti della matrice extracellulare cartilaginea sono il collagene II-cartilagine fibrillare specifico, con acido ialuronico e aggregati di proteoglicano-aggrecano, i quali conferiscono alla cartilagine le sue speciali proprietà fisiche. Nel momento in cui avviene l'ipertrofia dei condrociti, la sintesi del collagene II è soppressa ed inizia la sintesi del collagene X (Little *et al.*, 2005). Il collagene X è primariamente riscontrato nella zona ipertrofica e il suo ruolo è di facilitare la deposizione di calcio all'interno della matrice (Burdan *et al.*, 2009). Dunque, il collagene II può essere utilizzato come marcatore di formazione della matrice cartilaginea e il collagene X, come marcatore di ipertrofia condrocitaria (Shibata *et al.*, 1997).

Il Fibroblast growth factor (FGF) è essenziale per l'ossificazione endondrale. Mutazioni di FGF causano acondroplasia, la più comune displasia scheletrica umana. Recentemente, è stata identificata una forma di nanismo condrodisplasico nei bovini di razza Grigia Alpina (Murgiano *et al.*, 2014). Uno studio di re-sequenziamento completo del genoma ha evidenziato un singolo gene causale della malattia: il gene *EVC2*. Il sequenziamento di Sanger, ha evidenziato la delezione di due paia di basi nell'esone 19 di *EVC2*, considerata dunque l'eziologia del nanismo condrodisplasico nei bovini di razza Grigia Alpina (Murgiano *et al.*, 2014).

4.1.1.Scopo dello studio

Lo scopo dello studio sperimentale è stato di:

- 1) descrivere le caratteristiche macroscopiche ed istologiche della sindrome di Ellis-van Creveld in bovini di razza Grigia Alpina, spontaneamente affetti e con mutazione nota del gene *EVC2*.
- 2) Valutare il grado di differenziazione e l'indice di proliferazione della cartilagine di accrescimento, al fine di individuare il meccanismo patogenetico sottostante la sindrome di Ellis-van Creveld.
- 3) Determinare il livello di espressione dell'mRNA di *EVC* ed *EVC2* nelle ossa dei bovini con condrodisplasia.

4.1.2. Materiali e metodi

Lo studio è stato realizzato in collaborazione con l'Università di Berna (CH), con l'università di Massey (NZ) e l'AUSL di Bolzano.

Esame necroscopico ed istologico

Cinque vitelli (3 femmine e 2 maschi, di età compresa tra i 2 mesi e 1 anno), con diagnosi clinica di condrodisplasia sono stati sottoposti ad esame necroscopico. La diagnosi di sindrome di EvC, è stata preventivamente identificata, dato che gli stessi animali erano stati inclusi nello studio che ha trovato la delezione sul gene *EVC2* (Murgiano *et al.*, 2014). Le ossa di due bovini di razza Grigia Alpina, di 4 e 6 mesi di età, regolarmente macellati,

sani e non affetti dalla mutazione genica, sono state utilizzate come controlli. Le ossa e i tessuti molli sono state campionate e fissate in formalina tamponata al 10%. Le sezioni di ossa, di 1 cm di spessore, ottenute dal sezionamento longitudinale con sega rotante a nastro verticale, successivamente alla fissazione sono state decalcificate in una soluzione di EDTA al 10%.

I campioni sono stati processati e inclusi in paraffina, secondo procedure routinarie. Sezioni di 4 micron di spessore, di tessuti molli e tessuti duri campionati, sono state tagliate al microtomo e colorate con ematossilina-eosina (EE).

Immunoistochimica

Dai campioni di osso decalcificato ed incluso in blocchi paraffina sono state tagliate al microtomo cinque sezioni seriali, su cui è stata effettuata l'immunoistochimica con anticorpi per collagene II, collagene X, sonic hedgehog (SHH), fibroblast growth factor-2 (FGF2), e Ki67. I campioni di osso esaminato provenivano da femore, omero, vertebra e costola di ogni animale esaminato all'esame necroscopico.

Le sezioni sono state sparaffinate con Solvent plus, reidratate in alcool a concentrazione decrescente, con passaggi da 3', fino al lavaggio in acqua distillata. Successivamente sono state bloccate le perossidasi endogene, con immersione dei vetrini in una soluzione di H₂O₂ al 3% in metanolo, per 30' a temperatura ambiente. Per il riscontro di collagen II, collagen X e SHH è stato effettuato uno smascheramento dei siti antigenici di tipo

enzimatico con ialuronidasi testicolare bovina al 2,5% (Type I-S, 400-1000 units/mg solid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0,01 M di tampone fosfato salino (PBS/ phosphate buffered saline) a pH 7,4, contenente Triton X-100 (0,025%), per 60' a 37°C (Soeta *et al.*, 2007). Per identificare Ki67 e FGF2, lo smascheramento è stata effettuato in tampone citrato a pH 6,0, per 40' in bagno termostatico a 95°C, seguito da raffreddamento a T° ambiente per 20'.

Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi anti- collagene II, -collagene X, -SHH, -FGF2 e Ki67, overnight a 4°C in frigorifero.

Il giorno dopo, i siti di legame con l'anticorpo primario sono stati rivelati dall'uso di un anticorpo secondario biotinilato, diluito 1:200 e sono stati amplificati utilizzando un kit commerciale di avidina-biotina-perossidasi (VECTASTAIN® ABC Kits, Peterborough, UK). La reazione è stata evidenziata con il cromogeno 3,30-diaminobenzidina (DAB) allo 0,05% per 3' a temperatura ambiente. I vetrini sono stati successivamente contro-colorati con ematossilina di Papanicolaou.

Per tutti gli anticorpi testati sono state utilizzate sezioni di osso di controllo di due bovini di razza Grigia Alpina di 4 e 6 mesi. Le sezioni di controllo, comprendenti epifisi, cartilagine di accrescimento e metafisi omerale, sono state utilizzate al fine di valutare la cross-reattività degli anticorpi utilizzati con il tessuto della specie bovina e di individuare inoltre la specificità della reazione immunostochimica. I due controlli positivi sono stati sottoposti alle stesse procedure di fissazione e decalcificazione dei tessuti patologici.

Inoltre, al fine di valutare gli artefatti secondari alla procedura di decalcificazione, per ogni anticorpo testato, sono stati utilizzati controlli positivi di tessuti molli non decalcificati di bovino, con reattività immunoistochimica nota, quali: vescica urinaria per SHH, polmone e cartilagine bronchiale per collagene II, intestino tenue per Ki67 e tessuto di granulazione per FGF2. Per il collagene X non sono noti in letteratura tessuti molli con reattività specifica, pertanto è stato utilizzato come controllo positivo unicamente l'osso di vitelli sani, con reattività specifica nel citoplasma dei condrociti della zona ipertrofica della cartilagine di accrescimento. L'omissione dell'anticorpo primario su sezioni di osso di controllo, ha permesso di ottenere i controlli negativi, atti a valutare i legami aspecifici dell'anticorpo secondario e dunque la validità della reazione immunoistochimica. Le specifiche tecniche degli anticorpi utilizzati sono riassunte in **Tabella 1**.

Tabella 1: Specifiche tecniche degli anticorpi.

Anticorpo	Clone	Produttore	Diluizione
Collagen II	II-4C11	Novus Biologicals, Cambridge, UK	1:500
Collagen X	Polyclonal	Bioss Inc., Woburn, Massachusetts, USA	1:100
SHH	Polyclonal	Bioss Inc., Woburn, Massachusetts, USA	1:500
FGF2	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Texas U.S.A.	1:400
Ki67	MIB-1	DAKO, Glostrup, Denmark	1:600

La valutazione della colorazione immunohistochimica è stata eseguita primariamente in modo semi-quantitativo (positivo o negativo); inoltre in ogni campione positivo, all'interno della cartilagine di accrescimento sono state valutate:

- la localizzazione: zona di riserva, zona proliferativa, e zona ipertrofica;
- la distribuzione: diffusa, focale, multifocale e localmente estesa;
- intensità: forte, moderata, debole;

Per l'anticorpo anti-Ki67, è stato calcolato l'indice di proliferazione, ottenuto dalla conta dei nuclei positivi sul totale dei nuclei, in 5 campi a forte ingrandimento (40x). La conta è stata effettuata utilizzando un software di analisi di immagine: ImageJ (ImageJ, <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Analisi molecolare

Durante l'esame necroscopico sono stati collezionati e conservati in RNA-later (Life technologies, Gaithersburg, MD) campioni di tibia, fibula, omero, femore, tarso, lamina dell'unghia, costola, vertebra, cuore, trachea, testicolo e denti di un soggetto affetto da condrodiplosia e un vitello di controllo.

Presso l'istituto di genetica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Berna, è stato estratto l'RNA dai campioni ed è stata effettuata la Reazione a catena delle polimerasi-trascrittasi inversa (RT-

PCR). L'RNA è stato estratto utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen GmbH, Germania). I tessuti (100 mg) sono stati finemente schiacciati con l'impiego di mezzi meccanici (tre cicli da 1' in Tissue Lyser, Retsch, Qiagen) in un tubo di 2 ml contenente perline di acciaio inossidabile e 1 ml di TRIZOL (Ambion, Austin, TX, USA). Successivamente sono stati aggiunti 200 microlitri di cloroformio e l'RNA è stato separato mediante centrifugazione (12000 g, 15 min, 4° C). Ulteriori passaggi sono stati effettuati come raccomandato dal produttore. La rimozione del DNA genomico e la sintesi di cDNA è stata eseguita utilizzando il kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen GmbH, Germany), 200 ng RNA, e oligo dT mix. Il prodotto cDNA è stato amplificato utilizzando i primer EVC, EVC2. La PCR è stata effettuata utilizzando AmpliTaq Gold 360 Mastermix (Life Technologies, Carlsbad, Stati Uniti d'America) con le seguenti condizioni: 10 minuti a 95° C per preriscaldamento, poi 1 min a 95°C, 40 secondi a 60° C e 1 min a 72° C per 34 cicli. I prodotti di PCR ottenuti sono stati separati su un gel di agarosio al 2% con 0,5 mg/ml di bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV con un transilluminatore. I prodotti di RT-PCR sono stati purificati mediante ExoSAP-it® (Affymetrix Santa Clara, CA, USA) e direttamente sequenziati utilizzando i primer PCR su un sequenziatore capillare ABI 3730 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). I dati della sequenza sono stati analizzati utilizzando Sequencher 5.1 (GeneCodesCorporation).

4.1.3. Risultati

Caratteristiche necroscopiche

All'esame necroscopico, gli arti di tutti i vitelli erano corti e voluminosi in maniera sproporzionata, ruotati ad arco con una forma tipo a "manubrio". Femore e tibia presentavano una rotazione angolare mediale verso l'esterno, suggestiva di un ginocchio varo. Le ossa lunghe erano gravemente ridotte in lunghezza, con una diafisi molto corta (**Fig. 1; Fig. 2**). I risultati morfometrici di ossa lunghe con condrodisplasia e ossa lunghe normali sono stati riassunti in **Tabella 2**.



Figura 1: Femore di un soggetto affetto da EvC. Notare il marcato accorciamento della diafisi. Foto pubblicata su Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 6th edition, chapter 1, page 40, proveniente dall'archivio delle immagini del Servizio di Anatomia Patologica, DIMEVET, Università di Bologna.

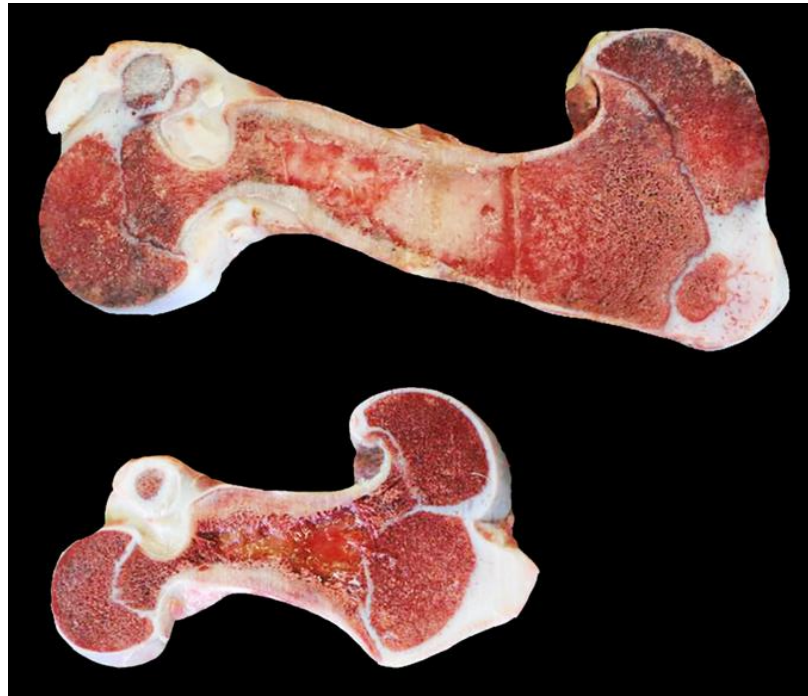


Figura 2: Sezioni di osso normale (in alto) e osso di vitello EvC (in basso) con marcato accorciamento della diafisi. Foto pubblicata su Muscatello *et al.*, 2015.

Tabella 2: Risultati morfometrici di femore e omero di vitelli affetti da EvC e vitello di controllo.

ID	Delezione <i>EVC2</i>	Sesso	Età (mesi)	Femore		Omero	
				Lunghezza totale (cm)	Lunghezza diafisi (cm)	Lunghezza totale (cm)	Lunghezza diafisi (cm)
1	Si	F	2	21	8	15	5.5
2	Si	F	3	18.5	5	12	4
3	Si	F	5	21	6	17	4
4	Si	M	2	21	5	14.5	4
5	Si	M	12	25	6	20	4.5
6	No	M	6	23	10	23	7.5

Negli animali EvC sottoposti ad esame necroscopico, l'omero era l'osso più gravemente accorciato e malformato, suggestivo di una condrodisplasia di tipo rizomelico. In termini di gravità il femore, era secondo all'omero per alterazioni morfologiche. Il radio, l'ulna, tibia, fibula, metacarpo e metatarso, falangi prossimali e distali, vertebre e coste non presentavano alterazioni macroscopicamente evidenti riguardo forma e lunghezza. La cartilagine epifisaria articolare del femore di un vitello (n° 5), presentava un'area localmente estesa di 9x6 cm di ulcerazione. Nei soggetti esaminati, a dispetto di quanto noto nella sindrome EvC umana, non erano presenti polidattilia e displasia ectodermica, con assenza di alterazioni a carico di unghie, peli e denti.

Il vitello n° 3 presentava alterazioni cardiache, caratterizzate da endocardiosi valvolare mitralica e associate lesioni di fibrosi sub-endocardica atriale (jet impact lesions). Il vitello n° 4 aveva cardiomegalia, dilatazione del tronco comune dell'arteria polmonare e forame ovale pervio (2-3 mm di diametro). Il vitello n° 5 presentava criptorchidismo monolaterale destro, con la presenza di un testicolo intraddominale atrofico delle dimensioni 5,5 cm, rispetto al testicolo sinistro normale di 8,5 cm.

Caratteristiche Istopatologiche

La principale alterazioni osservate consistevano in un ispessimento irregolare con lingue di cartilagine costituite da condrociti proliferativi e ipertrofici che si estendevano fino alla metafisi. Occasionalmente, le lingue di cartilagine formavano isole, con separazione dalla cartilagine di

accrescimento. La matrice cartilaginea, multifocalmente, si presentava eosinofila, caratteristica indicativa di degenerazione della matrice. Nel femore prossimale del vitello n° 2, l'ossificazione encondrale occorreva all'interno della cartilagine di accrescimento, risultando in una duplicazione della fisi. Multifocalmente alcune fisi mostravano rarefazione della matrice cartilaginea con esposizione delle fibre di collagene (condrolisi).

Nei soggetti di controllo, la cartilagine di accrescimento era costituita da una zona di riserva, una zona proliferativa, una zona ipertrofica, quest'ultima con ulteriore suddivisione in una zona pre-ipertrofica e ipertrofica (**Fig. 3**). La zona proliferativa presentava un maggiore spessore rispetto alle altre. La cartilagine di accrescimento si continuava bruscamente nella spongiosa primaria, sequenzialmente alla quale originava la spongiosa secondaria.

La spessore della fisi era variabilmente alterato, caratterizzato generalmente da una marcata espansione della zona di riserva e da una riduzione dello spessore della zona proliferativa e della zona ipertrofica (**Fig. 4**), rispetto al normale (**Fig. 3**), con perdita di demarcazione tra una zona e l'altra. Occasionalmente, lo spessore delle zone della fisi era normale, se comparato a quello dei soggetti di controllo; tuttavia i condrociti erano spesso disposti in maniera disordinata e in piccoli gruppi, con perdita della normale disposizione colonnare (**Fig. 5**). La lesione principale a carico della spongiosa primaria era un troncamento della trabecole metafisarie, con lieve disorganizzazione della spongiosa primaria e mancata fusione delle spicole di cartilagine con le trabecole della spongiosa secondaria.

Nella spongiosa secondaria le trabecole erano marcatamente sottili con disposizione in un pattern “a nido d’ape”, con assenza di allineamento lungo le linee di forza applicate sull’osso.

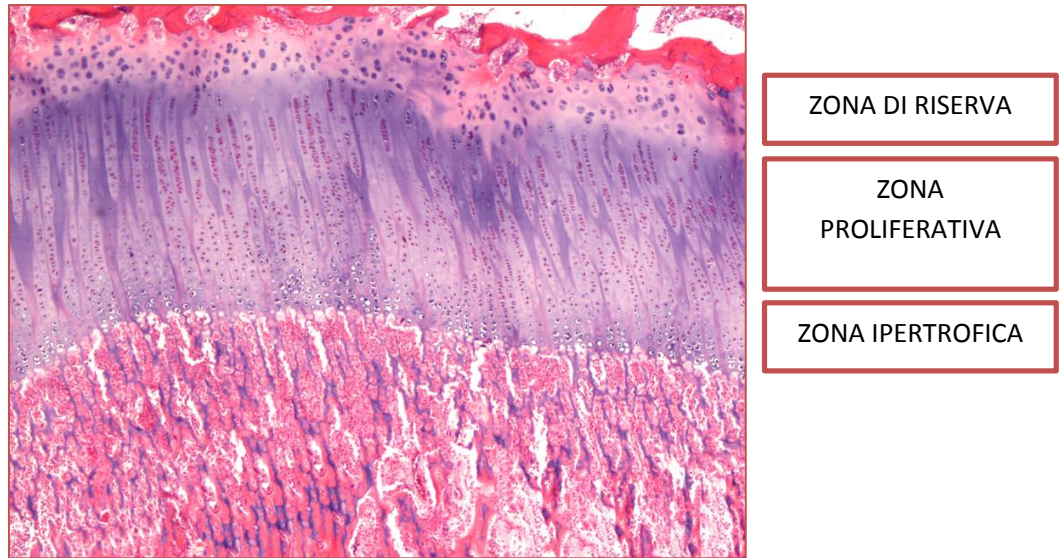


Figura 3: Cartilagine di accrescimento di un vitello di controllo. Notare la suddivisione in 3 zone e la normale prominente della zona proliferativa. Foto pubblicata su Muscatello *et al.*, 2015.

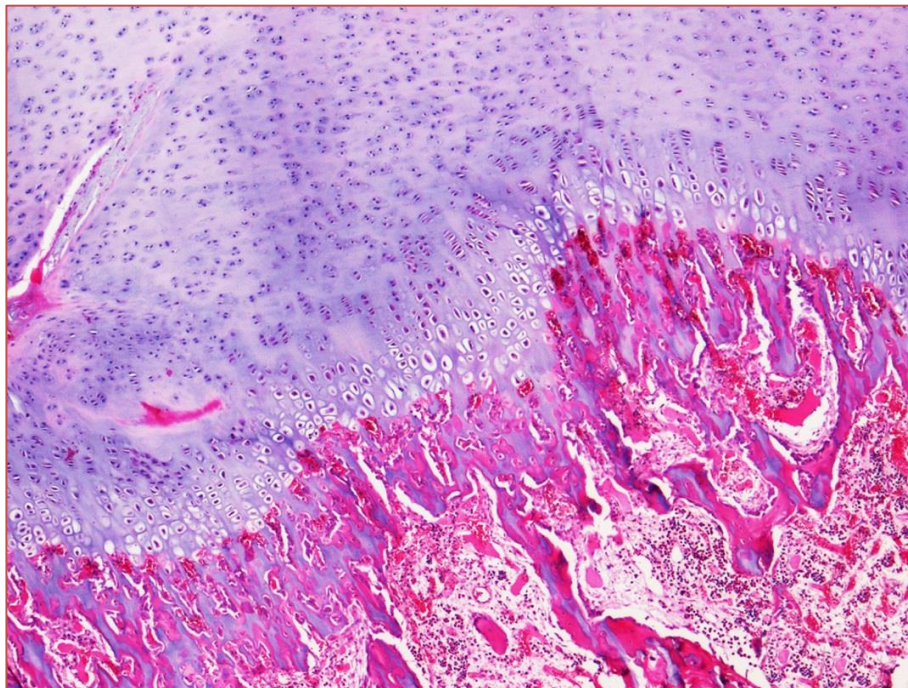


Figura 4: Vitello EvC, espansione della zona di riserva, riduzione dello spessore della zona proliferativa e troncamento delle trabecole metafisarie. Foto pubblicata su Muscatello *et al.*, 2015.

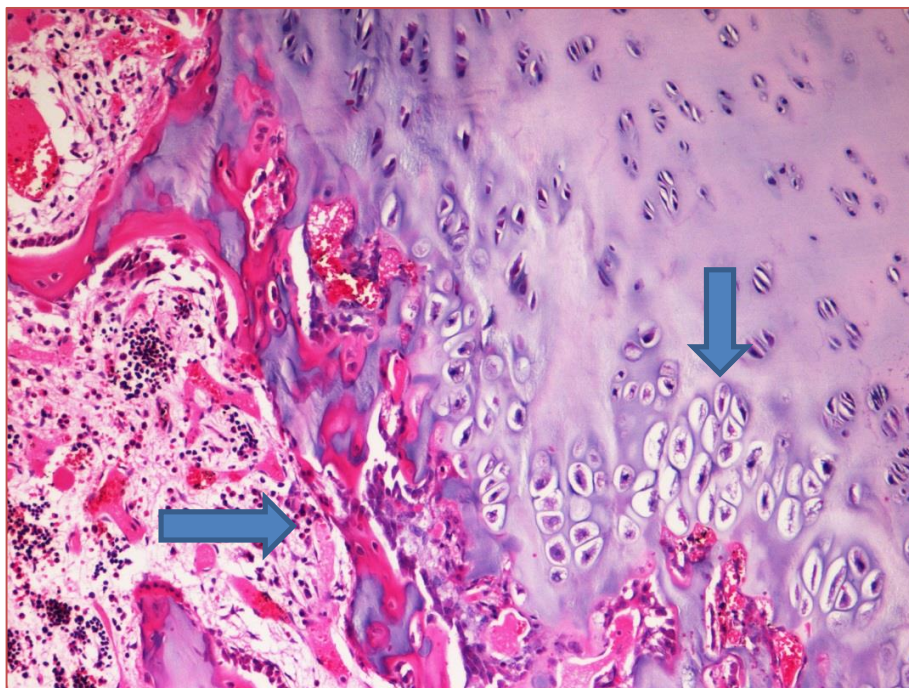


Figura 5: Vitello EvC, perdita della disposizione colonnare e formazione di gruppi di condrociti ipertrofici (freccia verticale); linea di arresto di crescita (freccia orizzontale). Foto pubblicata su Muscatello *et al.*, 2015.

Risultati immunoistochimici

Collagene II

Nelle sezioni di osso dei vitelli controllo, il collagene II era espresso diffusamente e intensamente nella matrice cartilaginea di tutte e tre le zone della cartilagine di accrescimento, della spongiosa primaria e della spongiosa secondaria (**Fig. 6**). Analogamente ai vitelli di controllo, nei casi n°1, 2, 3, l'espressione di collagene II era forte e diffusa nella matrice cartilaginea di tutte e tre le zone della cartilagine di accrescimento, nella matrice della spongiosa primaria e nelle spicole di cartilagine ritenute nelle trabecole ossee della spongiosa secondaria. Una reattività di collagene II forte e intensa, nel caso n° 4, è stata riscontrata solo a livello di matrice cartilaginea delle fisi costale. In omero e femore del caso n° 4, ed in femore e vertebra del caso n° 5, la reattività di collagene II era assente nella zona di riserva e debole nelle zone proliferativa ed ipertrofica (**Fig. 7**). In queste sezioni, per contro, una forte positività era visibile nelle spicole di cartilagine ritenute nelle trabecole della spongiosa secondaria. Nel vitello n° 5, il collagene II mostrava un pattern cellulare particolare: quando era espresso nella matrice formava un anello peri-condrocitario e il citoplasma dei condrociti era negativo; viceversa, quando era espresso nel citoplasma era assente l'anello peri-condrocitario (**Fig. 8**).

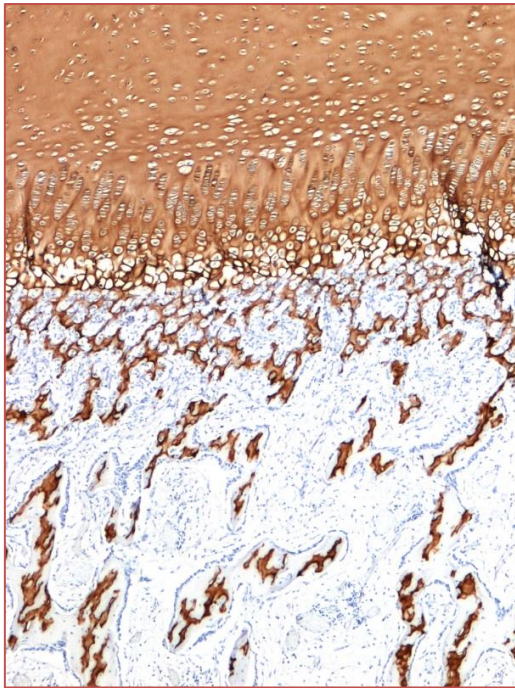


Figura 6: Vitello di controllo, espressione intensa e forte nella matrice cartilaginea, 4x, DAB. Muscatello *et al.*, 2015.

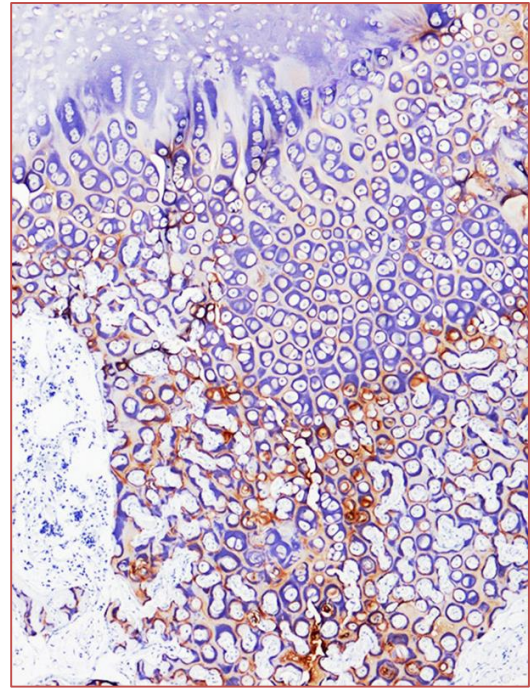


Figura 7: Vitello EvC, perdita di espressione nella zona di riserva e ridotta espressione nella zona proliferativa, 4x, DAB. Muscatello *et al.*, 2015.

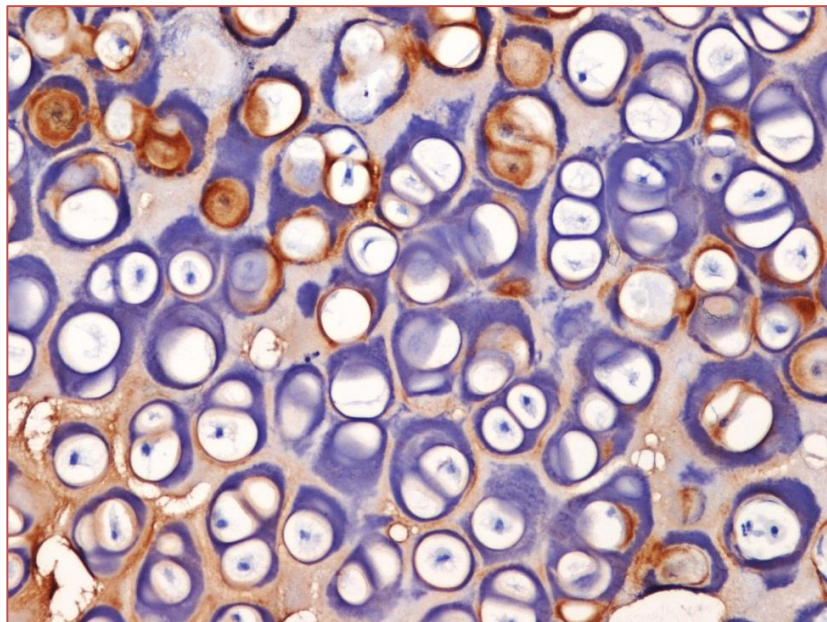


Figura 8: Vitello EvC, pattern peri-condrocitario/citoplasmatico di collagene II, 40x, DAB. Muscatello *et al.*, 2015.

Collagene X

Nelle sezioni dei soggetti di controllo, il collagene X era presente restrittivamente a livello della zona ipertrofica, dove era espresso a livello della matrice cartilaginea attorno ai condrociti ipertrofici formando un anello peri-condrocitario (**Fig. 9**). Inoltre, era presente immunoreattività nel citoplasma dei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici. In tutti i soggetti condrodisplastici, l'espressione peri-condrocitaria di collagene X era generalmente assente, mentre era multifocalmente presente la positività citoplasmatica e una debole aspecifica espressione nella matrice della zona ipertrofica (**Fig. 10**). Una reattività forte era presente nella matrice cartilaginea della spongiosa primaria e nelle spicole di cartilagine ritenute nelle trabecole ossee della spongiosa secondaria.

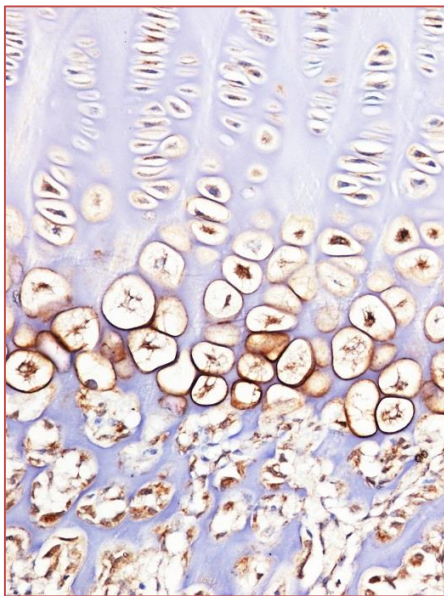


Figura 9: Vitello di controllo: positività per collagene X, con formazione di un anello peri-condrocitario nella matrice dei condrociti ipertrofici, 20x, DAB. Muscatello *et al.*, 2015.

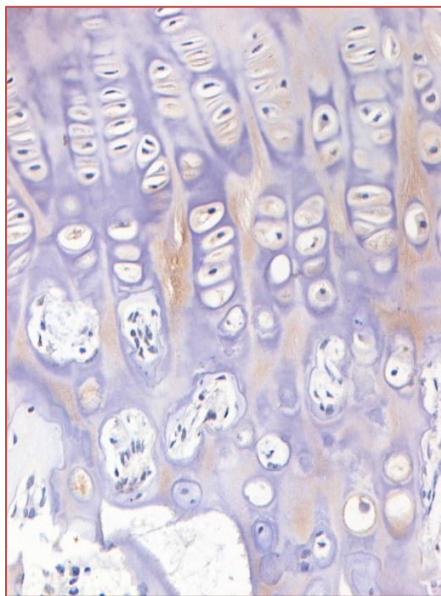


Figura 10: Vitello EvC, assenza di reattività peri-condrocitaria per collagene X, 20x, DAB. Muscatello *et al.*, 2015.

Sonic Hedgehog (SHH)

SHH, nelle sezioni di controllo, era diffusamente espresso nel citoplasma dei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici e aveva una debole espressione nella matrice della spongiosa primaria e nelle spicole di cartilagine della spongiosa secondaria. Nei vitelli affetti da condrodiplosia, SHH era presente analogamente ai controlli nei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici ma con una espressione multifocale (**Fig. 13**); variabilmente intensa era l'espressione nella matrice cartilaginea della spongiosa primaria e secondaria.

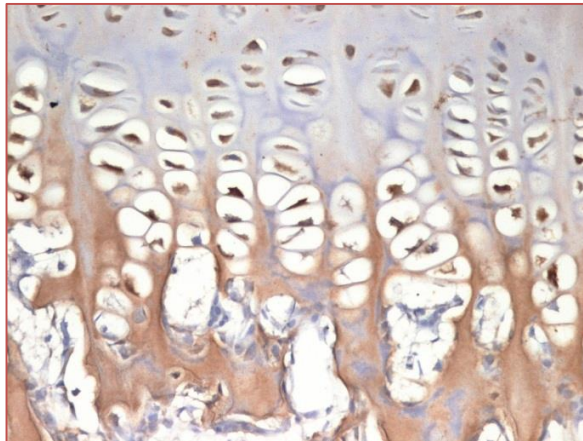


Figura 13: vitello EvC, espressione di SHH nel citoplasma dei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici e nella matrice cartilaginea, 20x, DAB.

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

FGF2 era espresso in entrambi i controlli nel citoplasma dei condrociti di tutte le zone della fisi. Nei soggetti affetti da EvC nella maggior parte delle sezioni non era presente immunoreattività per FGF2 (**Fig. 14**), eccezion fatta per una occasionale espressione in due vitelli. Il vitello n° 4 presentava

multifocale immunoreattività nel citoplasma dei condrociti proliferativi e di riserva, e il vitello n° 1 reattività nel citoplasma dei condrociti ipertrofici, ma non dei proliferativi e di quelli di riserva.

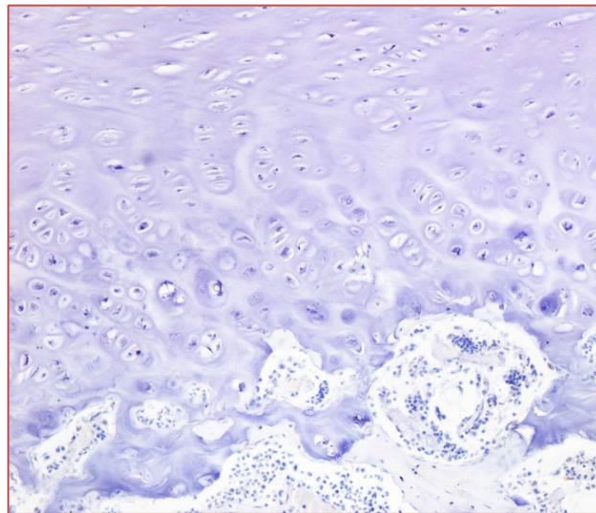


Figure 14: Vitello EvC, assenza di reattività per FGF, 20x, DAB.

Ki67

Nei vitelli di controllo, il ki67 era espresso con positività nucleare nel citoplasma dei condrociti della zona proliferativa e solo raramente della zona di riserva. Gli indici di proliferazione nei due soggetti erano il 19,7% e il 12,1%. Il ki67 era espresso più raramente nei condrociti della zona proliferativa dei vitelli condrodiplosici, dimostrato da un indice di proliferazione medio del 7,4%.

I risultati immunohistochimici complessivi dei marcatori utilizzati nei soggetti affetti da EvC e nei soggetti di controllo, sono riassunti in **Tabella 3**.

Tabella 3: Risultati immunostochimici in relazione alla sede anatomica nella fisi e nella metafisi.

	COLL II		COLL X		SHH		FGF2		Ki67	
	CTR	EVC2	CTR	EVC2	CTR	EVC2	CTR	EVC2	CTR	EVC2
Condrociti di riserva	+	+/-	-	-	-	-	+	-/+	+/-	+/-
Condrociti proliferativi	+	+	-	-	-	-	+	-/+	+	+/-
Condrociti pre- ipertrofici	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-	-
Condrociti ipertrofici	+	+	+	+/-	+	+	+	-/+	-	-
Matrice zona ipertrofica	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
Spongiosa primaria	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	-
Spongiosa secondaria	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	-

+ positivo; - negativo; +/- variabilmente positivo; -/+ principalmente negativo ma occasionalmente positivo;

Trascritti di EVC ed EVC2

La RT-PCR con primer target verso una regione che includeva gli esoni da 17 a 19 per EVC, e da 18 a 20 per EVC2 (mirando la regione contenente la delezione c.2993_2994ACdel), ha evidenziato la presenza del trascritto EVC ma anche di EVC2, confermata dal Sanger sequencing.

4.1.4. Discussione

La condrodisplasia bovina ad eziologia genetica, causata da una mutazione autosomica recessiva del gene *LIMBIN* (ortologo dell'umano *EVC2*) è stata descritta per la prima volta nei bovini di razza Bruna Giapponese (Takeda *et al.*, 2002). Di recente Murgiano *et al.*, (2014) hanno individuato una delezione sul gene *EVC2*, come causa responsabile di condrodisplasia in vitelli di razza Grigia Alpina. In questi bovini con delezione nota di *EVC2*, nel presente studio sono state descritte le caratteristiche macroscopiche, istologiche, immunohistochimiche e molecolari, ed investigato il ruolo del fattore di crescita dei fibroblasti-2 (Fibroblast Growth Factor-2) in relazione a proteine strutturali e del ciclo cellulare nella differenziazione della cartilagine di accrescimento in vitelli affetti da condrodisplasia di Ellis van Creveld. I rilievi macroscopici nei vitelli con delezione di *EVC2* hanno portato ad una diagnosi di nanismo disarmonico (condrodisplasia). Sono descritti nel vitello numerosi tipi di nanismo su base genetica, quali la condrodisplasia di tipo Bulldog, Telemark, i tipi brachicefalico, dolicocefalico e rizomelico (Thompson *et al.*, 2007). Basandosi sui rilievi macroscopici, la condrodisplasia nei bovini di razza Grigia Alpina, non sono riconducibili ad un fenotipo brachicefalico, a causa dell'assenza di brachicefalia e un minore o assente coinvolgimento dei metacarpi. I nostri casi sono suggestivi di un fenotipo rizomelico, con principali alterazioni a carico delle ossa lunghe e in particolare con prominente accorciamento degli arti anteriori, come descritto nei bovini di razza Bruna Giapponese (Thompson *et al.*, 2007).

Nell'uomo la sindrome EvC è una patologia multifattoriale, caratterizzata da malformazioni cardiache nel 60% dei pazienti (Sund *et al.*, 2009), con particolari alterazioni a carico del setto atrioventricolare (Ruiz-Perez *et al.*, 2009). La prognosi di EvC nell'uomo è correlata alla gravità delle lesioni cardiovascolari (Ruiz-Perez *et al.*, 2009). In due dei vitelli dello studio erano presenti patologie cardiache, quali endocardiosi valvolare mitralica in un caso, e difetto del setto interatriale con foro ovale pervio nell'altro caso. Patologie genitali sono riportate nella sindrome umana, quali criptorchidismo, ipospadia e mucometra (Baujat *et al.*, 2007); analogamente, nel vitello n° 5 era presente criptorchidismo.

Le principali alterazioni istologiche nelle ossa dei bovini affetti da EvC erano centrate sulla cartilagine di accrescimento.

La cartilagine di accrescimento dei mammiferi, anche nota come fisi, è una struttura mesodermica altamente specializzata. Ogni fisi è una struttura di tipo "sandwich-like", caratterizzata da strati multipli di zone funzionali quali: la zona di riserva, la zona proliferativa, la zona ipertrofica (Burdan *et al.*, 2009). Sequenzialmente alla zona ipertrofica avviene la mineralizzazione della cartilagine e la formazione della spongiosa primaria che poi si rimodella a formare la spongiosa secondaria (Burdan *et al.*, 2009).

I condrociti sono cellule metabolicamente attive, che sintetizzano vari elementi della matrice extracellulare (Johnstone *et al.*, 2000), come il collagene II. Il collagene II-cartilagine fibrillare specifico rappresenta il principale componente della matrice cartilaginea (Mackie *et al.*, 2008) ed è

espresso dalla matrice cartilaginea stessa, dunque utilizzato come marcatore di differenziazione della cartilagine (Huch *et al.*, 2002).

L'analisi immunoistochimica di cartilagini articolari di feti umani e di bambini di 18 mesi di età, ha dimostrato una colorazione omogenea per collagene II (Huch *et al.*, 2002). In vitelli di razza Bruna Giapponese è stata riscontrata immunoreattività per collagene II nella matrice della fisi (Soeta *et al.*, 2007). Analogamente, in 3 di 5 dei casi del presente studio, il collagene II era espresso con una colorazione diffusa e intensa in tutte le zone, nella spongiosa primaria e nelle spicole di cartilagine ritenute nella spongiosa secondaria. Negli altri due casi, era assente colorazione nella zona di riserva. Durante l'ossificazione encondrale, l'aggrecano e il collagene II sono riassorbiti (Little *et al.*, 2005). Nel momento in cui avviene l'ipertrofia dei condrociti, la sintesi di collagene II è soppressa e inizia la sintesi di collagene X (Mackie *et al.*, 2008). I nostri dati suggeriscono che essendoci una riduzione dell'espressione di collagene II, in due soggetti di 2 e 12 mesi, sia presente una prematura degradazione del collagene non età-correlata, ma che bensì sia dovuta ad una accelerata differenziazione dei condrociti della fisi, ad una ipertrofia ed ossificazione encondrale precoce.

Il collagene X, è invece un marcatore di differenziazione della cartilagine, un componente non-fibrillare specifico della matrice dei condrociti ipertrofici (Nagai *et al.*, 2002). La maturazione dei condrociti avviene in conseguenza di cambiamenti fisici e biochimici, che avvengono in un pattern spaziale e temporale (Burdan *et al.*, 2009). Il Collagene X, fisiologicamente, ha il ruolo

di facilitare la deposizione di calcio all'interno della matrice (Alvarez *et al.*, 2001). Nel momento in cui termina la differenziazione dei condrociti ipertrofici, il gene che codifica per Collagene X, Col10a1, cessa, di essere espresso e porta all'attivazione di un gruppo di geni, che inducono la mineralizzazione della matrice extracellulare e l'apoptosi cellulare (Burdan *et al.*, 2009). Il collagene X e l'ipertrofia, congiuntamente, sono indicatori di differenziazione terminale dei condrociti della fisi (Burdan *et al.*, 2009). Il collagene X era espresso nei condrociti ipertrofici dei bovini di razza Bruna Giapponese affetti da condrodiplosia (Soeta *et al.*, 2007). Nei vitelli del presente studio, era presente una diffusa e generale perdita di espressione del collagene X, con assenza dell'anello peri-condrocitario nella zona ipertrofica, ed espressione solo nel citoplasma dei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici e una espressione nella matrice della spongiosa primaria e secondaria. Pertanto, i nostri dati suggeriscono che i vitelli affetti dalla sindrome di EvC hanno un disordine di differenziazione condrocitaria caratterizzato da un'accelerata differenziazione ed una prematura ipertrofia. SHH gioca un ruolo importante nella differenziazione e nell'organizzazione della fisi, attivando indirettamente il recettore funzionale Smo (transmembrane protein smoothened), il quale recluta EVC/EVC2 al fine di attivare il fattore di trascrizione Gli (Briscoe *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Nel nostro studio sperimentale, non era presente una differenza di espressione consistente di SHH tra soggetti affetti da sindrome di EvC e i soggetti di controllo, con espressione di SHH, in entrambi i casi, a livello di

citoplasma dei condrociti pre-ipertrofici ed ipertrofici e nella matrice della spongiosa primaria e secondaria. In ossa lunghe di topi transgenici che sovraesprimevano SHH, è stato evidenziato un blocco della differenziazione allo stadio pre-ipertrofico, che ostacolava l'ossificazione endondrale e la formazione delle trabecole ossee (Tavella *et al.*, 2004).

Il ki67, è un marcatore di proliferazione cellulare e può essere utilizzato come misura dell'attività proliferativa della cartilagine di accrescimento. L'indice di proliferazione medio in soggetti affetti da condrodiplosia era più basso rispetto ai vitelli di controllo, indicativo dunque di una ridotta proliferazione dei condrociti, confermato da un accorciamento della zona proliferativa osservabile istologicamente.

Il fibroblast growth factor (FGF-2) è un membro della famiglia FGF ed è stato riscontrato, nell'uomo, nella zona di riserva (Krejci *et al.*, 2007), proliferativa ed ipertrofica della fisi (Nagai *et al.*, 2002). FGF è un potente ligando per tutti e quattro i recettori FGFR. La sovraespressione di FGF-2 in topi, causa un accorciamento e un appiattimento delle ossa lunghe e un alterazione della fisi con diminuzione dei condrociti ipertrofici (Nagai *et al.*, 2002). FGF2 è stato dimostrato essere uno dei più importanti membri della famiglia di FGF, espresso dai condrociti della fisi (Lazarus *et al.*, 2007). FGF è stato riscontrato nella zona proliferativa, pre-ipertrofica ed ipertrofica dei nostri vitelli di controllo, parallelamente a quanto riportato nelle fisi dell'uomo e di modelli animali (Nagai *et al.*, 2002; Krejci *et al.*, 2007). Nel vitello n° 4, FGF-2 era multifocalmente espresso nella zone di riserva e proliferativa, e

nel vitello n° 1 era presente occasionalmente nel citoplasma dei condrociti ipertrofici. Complessivamente, nella maggior parte dei vitelli affetti dalla sindrome EvC, l'espressione di FGF-2 era persa e assente nelle zone della fisi, rispetto ai vitelli di controllo. È riportato in letteratura che uno dei ruoli di FGF-2 è di indurre la proliferazione dei condrociti (Nagai *et al.*, 2002). In ratti a cui è stato inoculato FGF-2 per via endovenosa, è stato dimostrato un sostanziale aumento del numero di condrociti positivi al PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Nel presente studio sperimentale, un ridotto indice di proliferazione combinatamente ad una assenza di espressione di FGF-2, suggerisce che una sotto-regolazione di FGF-2 può essere responsabile di un ridotto indice di proliferazione, addizionalmente visibile come un accorciamento istologico della zona proliferativa.

A livello molecolare in conseguenza della delezione del gene *EVC2* nei vitelli con condrodiplasia si ipotizzava un meccanismo di “decadimento mediato da un nonsenso”, grazie al quale l'RNA mutato decade o le proteine troncate vengono degradate in maniera preventiva (Murgiano *et al.*, 2014), come accade nella sindrome EvC umana (Sund *et al.*, 2009). Sorprendentemente, la RT-PCR su campioni di osso ha rivelato la presenza dei trascritti sia di *EVC* che di *EVC2*, nei soggetti affetti, con assenza di sostanziali differenze rispetto ai controlli, indicativo di un mantenimento della trasduzione dell'mRNA, e del probabile intervento di un meccanismo post-trasduzionale di regolazione della proteina difettosa.

Riassumendo, la ridotta espressione del collagene II nella zona di riserva, suggerisce che possa essere prematuramente degradato portando alla secrezione di peptidi richiesti per l'induzione dell'ipertrofia condrocitaria. La perdita di espressione del collagene X nella matrice attorno ai condrociti ipertrofici è indicativo di una cartilagine pienamente differenziata, adulta. Il basso indice di proliferazione, indotto da una sotto-espressione di FGF-2, rinforza questa ipotesi.

4.1.5. Conclusione

In conclusione, le caratteristiche istologiche indicative di una differenziazione terminale della fisi, associate ad una prematura degradazione del collagene II, una abnorme espressione del collagene X, un basso indice di proliferazione insieme ad una perdita di espressione di FGF-2, sono tutti riscontri indicativi che la patogenesi della sindrome di Ellis-van Creveld bovina trova i suoi assiomi in una ipertrofia precoce e una differenziazione accelerata dei condrociti della fisi, che porta ad un difetto di ossificazione endocranale ed una ossificazione precoce. Inoltre, le somiglianze con la sindrome umana, eleggono il bovino, come utile modello animale spontaneo per studi di medicina traslazionale.

4.1.6. Bibliografia

- Alvarez J, Balbín M, Fernández M, López JM. Collagen metabolism is markedly altered in the hypertrophic cartilage of growth plates from rats with growth impairment secondary to chronic renal failure. *J Bone Miner Res.* 2001;16(3):511-524.
- Baujat G, Le Merrer M. Ellis-van Creveld syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:27.
- Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(7):416-429.
- Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, *et al.* Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia HistochemCytobiol.* 2009;47(1):5-16.
- Craig, Dittmer and Thompson. Bones and joints. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2015.
- Ellis RW, van Creveld S. A Syndrome Characterized by Ectodermal Dysplasia, Polydactyly, Chondro-Dysplasia and Congenital Morbus Cordis: Report of Three Cases. *Arch Dis Child.* 1940;15(82):65-84.
- Galdzicka M, Patnala S, Hirshman MG, *et al.* A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Mol Genet Metab.* 2002;77(4):291-295.

- Huch K, Mordstein V, Stöve J, *et al.* Expression of collagen type I, II, X and Ki-67 in osteochondroma compared to human growth plate cartilage. *Eur J Histochem.* 2002;46(3):249-258.
- Jenkins D, Winyard PJ, Woolf AS. Immunohistochemical analysis of Sonic hedgehog signalling in normal human urinary tract development. *J Anat.* 2007;211(5):620-629.
- Johnstone EW, Leane PB, Kolesik P, Byers S, Foster BK. Spatial arrangement of physeal cartilage chondrocytes and the structure of the primary spongiosa. *J Orthop Sci.* 2000;5(3):294-301.
- Kamal R, Dahiya P, Kaur S, Bhardwaj R, Chaudhary K. Ellis-van Creveld syndrome: A rare clinical entity. *J Oral MaxillofacPathol.*2013;17(1):132-135.
- Krejci P, Krakow D, Mekikian PB, Wilcox WR. Fibroblast growth factors 1, 2, 17, and 19 are the predominant FGF ligands expressed in human fetal growth plate cartilage. *Pediatr Res.* 2007;61(3):267-272.
- Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone.* 2007;40(3):577-86.
- Little CB, Meeker CT, Hembry RM *et al.* Matrix metalloproteinases are not essential for aggrecan turnover during normal skeletal growth and development. *Mol Cell Biol.* 2005;25(8):3388-3399.

- Mackie EJ1, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M.
Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62.
- Mckusick VA, Egeland JA, Eldridge R, Krusen DE. Dwarfism In The Amish I. The Ellis-Van Creveld Syndrome. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964;115:306-336.
- Murgiano L, Jagannathan V, Benazzi C *et al.* Deletion in the EVC2 gene causes chondrodysplastic dwarfism in Tyrolean Grey cattle. *PLoS One.* 2014;9(4):e94861.
- Muscatello LV, Benazzi C, Dittmer KE *et al.* Ellis-van Creveld Syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization. *Vet Pathol.* 2015 Sep;52(5):957-66.
- Nagai H, Aoki M. Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(3):142-147.
- Polymeropoulos MH, Ide SE, Wright M, *et al.* The gene for the Ellis-van Creveld syndrome is located on chromosome 4p16. *Genomics.* 1996;35(1):1-5.
- Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ *et al.* Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003;72(3):728-732.

- Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Rodriguez-Andres ME, *et al.* Evc is a positive mediator of lhh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development*. 2007;134(16):2903-2912.
- Ruiz-Perez VL, Goodship JA. Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to hedgehog ligands. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151(4):341-351.
- Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Yamashita Y. Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J Anat*. 1997;191 (4):561-570.
- Soeta S, Shimoura H, Hatakeyama N, *et al.* Immunohistochemical examination of epiphyseal growth plates of Japanese Brown cattle with chondrodysplasia. *J Comp Pathol*. 2007;136(2-3):145-155.
- Sund KL, Roelker S, Ramachandran V, Durbin L, Benson DW. Analysis of Ellis van Creveld syndrome gene products: implications for cardiovascular development and disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18:1813–1824.
- Takeda H, Takami M, Oguni T, *et al.* Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10549-10554.

- Tavella S, Biticchi R, Schito A, *et al.* Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression. *J Bone Miner Res.* 2004;19(10):1678-1688.
- Thompson K. Bones and joints. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's *Pathology of domestic animals*. 5th ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2007: 13-33.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, *et al.* Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15): e115.
- Yang C, Chen W, Chen Y, Jiang J. Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2. *Cell Res.* 2012;22(11):1593-1604.

Il presente lavoro è stato pubblicato sulla rivista *Veterinary Pathology*:

Vet Pathol. 2015 Sep;52(5):957-66.

Ellis-van Creveld Syndrome in Grey Alpine Cattle: Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Characterization.

Muscatello LV, Benazzi C, Dittmer KE, Thompson KG, Murgiano L, Drögemüller C, Avallone G, Gentile A, Edwards JF, Piffer C, Bolcato M, Brunetti B.

Attribuendosi parte della copertina di un numero monografico sulle ossa:

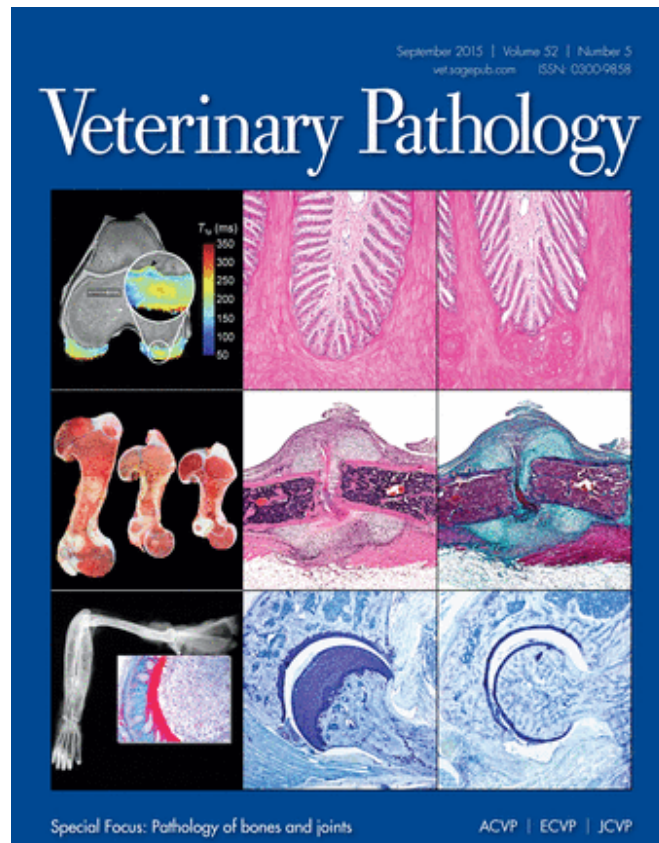


Figura 15: Copertina di Veterinary Pathology, Settembre 2015; Volume 52, numero 5.

Con questo studio è stato inoltre vinto il Premio AIPVET 2015.