

# VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA DELL'ESPRESSIONE DI CADERINA E IN CARCINOMI SQUAMOSI, CARCINOMI BASOSQUAMOSI E BASALIOMI CUTANEI DI CANE.

RICCABONI P., SIRONI G.

## INTRODUZIONE

Le caderine sono una grande classe di glicoproteine transmembrana coinvolte nell'adesione fra cellule omologhe; sono quindi elementi essenziali per la costituzione ed il mantenimento della corretta architettura dei tessuti. Per la loro specificità tissutale vengono suddivise in numerose sottoclassi; fra le principali vanno ricordate le caderine placentari (P Cad), quelle neurali (N Cad) e quelle epiteliali (E Cad) (Takeichi, 1991). L'interesse per queste proteine nello studio della patologia tumorale nasce dal fatto che, sia la capacità infiltrante che quella metastatizzante di un tumore, necessitano della "fuga" di alcune cellule dalla neoplasia primitiva e perché ciò possa verificarsi è necessario che vengano vanificati, almeno parzialmente, i sistemi di adesione intercellulari. *In vitro* l'assenza o l'inattivazione della caderina E è in grado di determinare una sdifferenziazione di cellule epiteliali normali che acquistano un fenotipo indifferenziato ed invasivo (Frixen *et al.*, 1991). Inoltre, studi clinico patologici in campo umano dimostrano che in numerosi carcinomi di varia origine l'espressione di caderina E appare ridotta o, talvolta, persino scomparsa (Birchmeir e Beherens, 1994).

Nel presente lavoro abbiamo studiato l'espressione di Caderina E in carcinomi squamosi, carcinomi basosquamosi e basaliomi cutanei di cane.

## MATERIALI E METODI

Per il presente studio sono stati esaminati campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina di carcinomi squamosi (17 casi), carcinomi basosquamosi (3 casi) e basaliomi (11 casi) cutanei di cane, tutti provenienti dal materiale biptico giunto all'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano negli anni 1994-95. Questi campioni vennero selezionati da una casistica più ampia sulla base della presenza ed immunoreattività, al loro interno, di strutture epiteliali normali come epidermide ed annessi cutanei, quindi considerati controllo positivo interno. L'indagine fu svolta utilizzando la tecnica immunistochemica Avidina-biotina perossidasi (ABC) associata a smascheramento antigenico in soluzione di tripsina (0,1%) e calcio cloruro (0,1%) a pH 7,8 per 15 minuti alla temperatura di 37°C; impiegando l'anticorpo DECMA 1 (Sigma, St. Luis, Missouri), anticorpo monoclonale di ratto anti Caderina E di topo, *cross*-reattivo con la Caderina E del cane (Vestweber e Kemler, 1985).

La valutazione dell'immunoreazione fu eseguita come descritto da Shiozaki *et al.* (1991) definendo E-CD + quei campioni in cui la positività espressa dalle

cellule neoplastiche era paragonabile, per intensità e distribuzione, alla positività dei controlli positivi interni; E-CD +/- quando si manifestava una riduzione dell'intensità nelle cellule neoplastiche; E-CD - quando vi era la totale scomparsa dell'immunomarcatura dalle cellule neoplastiche. Inoltre, il gruppo E-CD +/- fu ulteriormente classificato in base alla distribuzione della positività della colorazione definendo, quindi, campioni E-CD +/- omogenei quelli in cui la positività interessava l'intera membrana cellulare di tutte le cellule e campioni E-CD +/- eterogenei quando la positività veniva espressa da parti della membrana cellulare e non necessariamente da tutte le cellule.

## RISULTATI

La cute normale e gli annessi presenti nelle sezioni, da noi considerate come controlli positivi interni, presentarono immunoreazione intensa e uniformemente diffusa alla membrana cellulare di tutti i cheratinociti. Facevano eccezione quelli dello strato corneo e, nelle cellule dello strato germinativo, le porzioni di membrana cellulare in rapporto con la membrana basale.

L'immunomarcatura fu osservata in tutti i tessuti neoplastici considerati, ma in buona parte dei casi l'intensità della colorazione era ridotta (E-CD +/-) e spesso eterogenea. Dei 17 carcinomi squamosi (Tab.: I), tutti moderatamente ben differenziati, 4 mantenevano l'intensità e l'omogeneità dell'immunoreazione (E-CD +), paragonabile a quella del tessuto di controllo. In 13 casi fu, invece, osservata una riduzione dell'intensità dell'immunomarcatura (E-CD +/-), che in 3 casi aveva una distribuzione omogenea e nei restanti 10 era distribuita in modo eterogeneo. Nella maggior parte dei carcinomi squamosi E-CD +/- eterogenei, le zone più intensamente colorate (E-CD +) erano quelle maggiormente differenziate, frammiste ad aree E-CD +/- ed E-CD - per lo più caratterizzate da una progressiva perdita della differenziazione.

Dei 3 carcinomi basosquamosi esaminati (Tab.: I) 1 manteneva la positività (E-CD +), un altro presentava un'omogenea riduzione (E-CD +/-) dell'intensità, ed uno presentava un'immunomarcatura ridotta (E-CD +/-) ed eterogenea.

Anche nei basaliomi (Tab.: I) non si verificò mai la completa perdita della positività nelle cellule neoplastiche. In 5 degli 11 campioni l'espressione di Caderina E era mantenuta (E-CD +) e paragonabile al controllo interno positivo, mentre risultava ridotta nei restanti 6 casi. Fra questi ultimi, 1 caso presentava un'omogenea distribuzione della immunomarcatura, mentre nei restanti 5 casi la distribuzione appariva eterogenea.

## DISCUSSIONE

Le Caderine sono una superfamiglia di molecole necessarie al riconoscimento fra cellule vicine, alla morfogenesi e al mantenimento dell'integrità dei tessuti, tanto nei vertebrati quanto negli invertebrati (Buck, 1995). La loro espressione è correlata alla prevenzione dell'invasività da parte delle cellule di vari tumori epiteliali maligni (Behrens *et al.*, 1989). Ridotta espressione di Caderina E è stata osservata in tumori maligni umani di esofago, stomaco, colon, mammella, ovaio e prostata ed è stata correlata ad invasività e capacità metastatizzante (Birchmeir e Behrens, 1994). Resta comunque da chiarire se la riduzione dell'espressione di Caderina E sia un possibile

meccanismo di trasformazione maligna o, più semplicemente una conseguenza della sdifferenziazione neoplastica determinata da altri meccanismi oncogenetici.

Il risultato del nostro studio mostra che un'alterata espressione di Caderina E può essere spesso riscontrata anche in carcinomi squamosi cutanei di cane. Schipper *et al.* (1991) dimostrarono l'esistenza di una correlazione inversa fra l'espressione di Caderina E e la perdita di differenziazione nei carcinomi squamosi di testa e collo dell'uomo. Questi autori trovarono che nei carcinomi squamosi ben differenziati l'espressione di Caderina E era spesso paragonabile, per intensità e distribuzione, a quella dell'epitelio stratificato normale; in quelli moderatamente differenziati l'intensità era minore e la distribuzione spesso eterogenea, mentre nei carcinomi squamosi poco differenziati si verificava la perdita dell'espressione di caderina E. Nel nostro studio abbiamo osservato in buona parte dei carcinomi squamosi una riduzione e/o alterazione dell'espressione di Caderina E, ma in nessun caso la sua completa scomparsa. Non avendo nella nostra casistica nessun caso di carcinoma squamoso poco differenziato possiamo considerare il nostro risultato in accordo con quanto espresso in letteratura che, fra i carcinomi squamosi umani di testa e collo, segnala la scomparsa dell'espressione di Caderina E solo in quelli più sdifferenziati (Schipper *et al.*, 1991; Mattijssen *et al.*, 1993; Kadowaki *et al.*, 1994).

Una ridotta e/o eterogenea espressione di Caderina E è stata inoltre osservata in 2 dei 3 carcinomi basosquamosi. I carcinomi delle cellule basali sono raramente metastatizzanti, ma è noto che quelli della varietà basosquamosa spesso sono localmente più invasivi (Weiss e Frese, 1974). Quindi l'eterogeneità e la sottoespressione di Caderina E riscontrata nei 2 casi citati potrebbe ben correlarsi con la loro maggior invasività. Risultati analoghi vengono riportati da Pizzarro *et al.* (1994; 1995) che indicano una ridotta ed eterogenea espressione di Caderina E nei carcinomi a cellule basali più infiltrativi.

In fine, una ridotta ed eterogenea espressione di Caderina E è stata trovata in 5 degli 11 basaliomi studiati. Resta tuttavia da stabilire se tale riscontro sia da considerare un aspetto legato alla trasformazione neoplastica o non sia, invece, il riflesso e la conseguenza del fenotipo di origine della cellula basale che appare priva di Caderina E nei punti di contatto con la membrana basale.

Il risultato di questo lavoro, in sintesi, evidenzia che la riduzione e la eterogeneità dell'espressione di Caderina E può spesso essere osservata anche nei carcinomi squamosi, nei carcinomi basosquamosi e nei basaliomi cutanei del cane. Si rendono, tuttavia necessari ulteriori studi per valutare le eventuali correlazioni fra la diminuita espressione di Caderina E ed il comportamento clinico di questi tumori.

**Tabella I:** Espressione di Caderina E in carcinomi squamosi, carcinomi basosquamosi e basaliomi cutanei di cane.

	Espressione di Caderina E			
	+	+/-		-
		omogeneo	eterogeneo	
<b>Carcinomi Squamosi</b>	4/17	3/17	10/17	0/17
<b>Carcinomi Basosquamosi</b>	1/3	1/3	1/3	0/3
<b>Basaliomi</b>	5/11	1/11	5/11	0/11

### BIBLIOGRAFIA

1. BEHRENS J., MAREEL M.M., VAN ROY F.M., BIRCHMEIER W. (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion *Journal of Cell Biology* **108**, 2435-2447
2. BIRCHMEIER W. & BEHRENS J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta* **1198**, 11-26
3. BUCK C.A. (1995) Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process. In Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Liotta L.A. (eds): *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia, Saunders Co. p177
4. FRIXEN U.H., BEHRENS J., SACHS M., EBERLE G., VOSS B., WARDA A., LOCHNER D. & BIRCHMEIER W. (1991) E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *Journal of Cell Biology* **113**, 173-185
5. KADOWAKI T., SHIOZAKI H., INOUE M., TAMURA S., OKA H., DOKI Y., IIHARA K., MATSUI S., IWAZAWA T., NAGAFUCHI A., TSUKITA S., MORI T. (1994) E-Cadherin and  $\alpha$ -Catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Research* **54**, 291-296
6. MATIJSSSEN V., PETERS H.M., SCHALKWIJK L., MANNI J.J., VAN'T HOF-GROOTENBOER B., DE MULDER P.H.M., RUITER D.J. (1993) e-Cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *International Journal of Cancer* **55**, 580-585
7. PIZARRO A., BENITO N., NAVARRO P., PALACIOS J., CANO A., QUINTANILLA M., CONRTRERAS F., GAMALLO C. (1994) E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* **69**, 157-162
8. PIZARRO A., GAMALLO C., BENITO N., PALACIOS J., QUINTANILLA M., CANO A., CONRTRERAS F. (1995) Differential patterns of placental and epithelial cadherin expression in basal cell carcinoma and in the epidermis overlying tumours. *British Journal of Cancer* **72**, 327-332

9. SCHIPPER J., FRIXEN U.H., BEHRENS J., UNGER A., JAHNKE K., BIRCHMEIER W. (1991) E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Research* **51**, 6328-6337
10. SHIOZAKI H., TAHARA H., OKA H., MIYATA M., KOBAYASHI K., TAMURA S., IIHARA K., DOKI Y., HIRANO S., TAKEICHI M., MORI T. (1991) Expression of immunoreactive E-Cadherin adhesion molecules in human cancers. *American Journal of Pathology* **139**, 17-23
11. TAKEICHI M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455
12. VESTWEBER D., KEMLER R. (1985) Identification of a putative cell adhesion domain of uvomorulin. *EMBO Journal* **4**, 3393-3398
13. WEISS E., FRESE K. (1974) Tumours of the skin. In International histological classification of tumours of domestic animals. *Bulletin of the World Health Organization* **50**, 79-100