

# VALUTAZIONE COMPARATIVA DI *MARKERS* IMMUNOISTOCHIMICI PER LA DIAGNOSI DI MESOTELIOMA IN ANIMALI DOMESTICI.

Grieco V.<sup>1</sup>, Gelmetti D.<sup>2</sup>, Solimene N.<sup>1</sup>, Parodi M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare – Facoltà di Veterinaria – Università degli Studi di Milano.

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Sezione di Milano

## INTRODUZIONE

I mesoteliomi negli animali sono relativamente rari. Nella specie canina, ne sono segnalati poco più di 60 casi (Ilgren, 1993) mentre nel bovino, che è più spesso interessato da una forma di mesotelioma congenito, ne sono descritti circa una trentina (Stöber *et al.*, 1990; Wolfe *et al.*, 1991). In altre specie animali la letteratura riporta solo rare e sporadiche segnalazioni (McCullag *et al.*, 1979; Nordstoga e Landsverk, 1981; Lichtensteiger e Leathers, 1987). La rarità di questa neoplasia accresce notevolmente la difficoltà di pervenire ad una diagnosi clinica e di raccogliere una casistica più ampia. Anche la diagnosi anatomopatologica non è sempre facile e spesso si presenta la necessità di discriminare tra mesoteliomi ed altre neoplasie, soprattutto **carcinomi primari e secondari**, che possono interessare le sierose. Secondo gli orientamenti attuali il problema della diagnosi di mesotelioma nei casi dubbi viene affrontato con tecniche istochimiche, ultramicroscopiche ed immunoistochimiche. La principale caratteristica ultrastrutturale delle cellule mesoteliali neoplastiche è rappresentata da sottili e brevi microvilli (Haschimoto *et al.*, 1989). Immunoistochimicamente, mentre le cellule meglio differenziate in senso epiteliale esprimono citocheratine, una parte degli elementi neoplastici meno differenziati può coesprimere vimentina. Non esiste però a tutt'oggi un *marker* assolutamente specifico per il mesotelio, ragione per cui, soprattutto in medicina umana, si suole ricorrere all'impiego di un pannello di anticorpi relativamente ampio, mediante il quale restringere quanto più possibile il residuo dubbio diagnostico (Donna *et al.*, 1986; Montag *et al.*, 1988; Riera *et al.*, 1997). Poiché soltanto pochi *markers* sono stati finora impiegati nell'identificazione di mesoteliomi animali (Hinrichs *et al.*, 1997) abbiamo provato la reattività di alcuni anticorpi di recente produzione su campioni di mesoteliomi provenienti da animali di specie diversa.

## MATERIALI E METODI

I mesoteliomi selezionati per i test immunoistochimici sono costituiti da due mesoteliomi del cane (forme papillare e bifasica), due del gatto (forme papillari) e da due mesoteliomi congeniti del bovino. Da ciascun campione, fissato in formalina ed incluso in paraffina, sono state ottenute sezioni di 5  $\mu$  di spessore che sono state sottoposte a colorazione con Ematossilina-Eosina e con

tecnica immunistochemica secondo Hsu *et al.*, (1981). Gli anticorpi primari impiegati e le relative diluizioni sono riportati nella tabella seguente (l'anticorpo AMAD-1 è stato gentilmente fornito dal Prof. Donna dell'Ospedale della città di Alessandria)

<b>Anticorpo</b>		<b>Provenienza</b>	<b>Diluizione</b>
CK AE1/AE3	monoclonale	Boeringer	1:3000
Vimentina	monoclonale	SIGMA	1:20000
HBME-1	monoclonale	DAKO Corp.	1:400
AMAD-1	policlonale	Prof. Donna	1:300

Gli anticorpi diretti contro le cellule mesoteliali sono stati anche provati, per confronto, su sezioni ottenute da: due adenocarcinomi (tubulare e cistopapillifero) mammari del cane e due del gatto, due carcinomi bronchiolo-alveolari del cane e due del gatto, un carcinoma bronchiale del cane e uno del gatto, un adenocarcinoma intestinale del cane, un adenocarcinoma prostatico di cane e un polmone normale di bovino.

## RISULTATI

**Citocheratina AE1/AE3:** le cellule mesoteliali normali sono risultate sempre positive per la citocheratina così come quelle neoplastiche ad esclusione delle cellule in mitosi e di quelle multinucleate particolarmente indifferenziate. Tale positività è risultata costante in tutti i mesoteliomi esaminati appartenenti alle tre specie animali considerate (cane, gatto e bovino). In particolare, è da segnalare la positività di un ampio numero di cellule neoplastiche d'aspetto fusato nel mesotelioma bifasico di cane.

**Vimentina:** le cellule mesoteliali normali sono risultate sempre negative per vimentina. Per ciò che riguarda le cellule neoplastiche, soltanto nel mesotelioma papillare di cane abbiamo notato una estesa positività per vimentina, mentre negli altri casi l'espressione era assai debole e, soprattutto, limitata a poche cellule di isolate aree.

**AMAD-1:** l'immunoreattività di questo anticorpo è risultata debole ed in parte mascherata da un costante segnale di fondo. Tuttavia, per tutte le specie considerate era evidente un segnale più intenso e significativo nelle cellule mesoteliali normali. Infatti, pur risultando il loro citoplasma solo debolmente positivo, la costante negatività del nucleo rendeva significativa la marcatura. Per ciò che riguarda le cellule neoplastiche, quelle con immunocolorazione meglio rilevabile erano situate sulla superficie delle neoformazioni.

**HMBE-1:** l'anticorpo ha marcato in maniera assai soddisfacente e senza segnale di fondo le cellule mesoteliali normali e neoplastiche di cane, gatto e bovino. La positività era rappresentata da una sottile linea immunocolorata che circondava a mo' di orletto la parte libera delle cellule

evidenziando quindi in modo particolare, come per l'anticorpo precedente, quelle dello strato superficiale della neoplasia.

I controlli effettuati su altre neoplasie epiteliali hanno escluso che i due anticorpi diretti verso antigeni mesoteliali (AMAD-1 e HBME-1) reagissero verso alcuni epiteli tra quelli più soggetti a neoplasia nelle diverse specie considerate e precisamente verso: l'epitelio mammario normale e neoplastico del cane e del gatto (adenocarcinomi tubulari e cistopapilliferi); verso l'epitelio intestinale normale e neoplastico del cane (adenocarcinoma intestinale); verso l'epitelio normale e neoplastico bronchiolo-alveolare normale e neoplastico del cane e del gatto (adenocarcinoma bronchiolo alveolare); verso l'epitelio prostatico normale, iperplastico e neoplastico del cane. Gli stessi anticorpi non erano, però, in grado di distinguere le cellule mesoteliali dalle cellule bronchiali, sia normali che neoplastiche, del cane e del gatto e dall'epitelio bronchiale normale del bovino.

## DISCUSSIONE

Il problema di una diagnosi differenziale tra mesoteliomi e carcinomi degli animali si pone, soprattutto, all'esame istologico di biopsie o campioni tissutali non corredati da rilievi clinico-necroscopici dettagliati. In base ai risultati di questa ricerca, la doppia positività di cellule tumorali verso citocheratine e vimentina indicherebbe con sufficiente precisione la natura mesoteliale del tumore, ma non è risultata costante per la mancata espressione di vimentina da parte delle cellule similepiteliali. Va notato, inoltre, che nei mesoteliomi bifasici sebbene la positività di cellule fusate alle citocheratine sia, qualora presente, molto significativa, è d'altra parte praticamente impossibile distinguere giovani elementi stromali vimentina-positivi, da cellule mesoteliali neoplastiche fusate. L'insufficienza di questi due anticorpi per la precisazione della diagnosi di mesotelioma ha indotto i patologi umani all'impiego un più ampio ventaglio di *markers* (Ordoñez e Mackay, 1996; Fetsch *et al.*, 1997) comprendenti quelli provati nel presente studio (AMAD-1, HBME-1). L'anticorpo policlonale AMAD-1 che, sperimentato da Donna *et al.* (1986), su neoplasie umane ha dimostrato buona specificità per il mesotelioma in assenza di disturbo di fondo, impiegato su mesoteliomi animali ha prodotto risultati mascherati da un costante *background* aspecifico. Tuttavia, pur non costituendo da solo un elemento risolutivo, in pannello con gli altri anticorpi provati, ha contribuito ad avvalorare la diagnosi di mesotelioma. Per ciò che riguarda l'anticorpo monoclonale HBME-1, prodotto verso antigeni umani, l'intensa reattività sulla superficie libera delle cellule mesoteliali ha dimostrato che tale antigene è presente anche in animali di specie diverse. Analogamente a quanto verificato nei casi umani (Riera *et al.*, 1997) questo anticorpo non è stato però in grado di

discriminare tra cellule mesoteliali ed epiteli bronchiali normali o neoplastici. Complessivamente l'uso del pannello di anticorpi selezionati per questa indagine comparativa pur non portando a risultati di valore assoluto consente di migliorare l'approccio diagnostico attraverso un procedimento per esclusione.

Il raggiungimento di una corretta diagnosi di mesotelioma negli animali è di notevole interesse dal punto di vista della patologia comparata. Infatti così come per l'uomo, anche per il cane (Harbison e Godleski, 1983; Glickman *et al.*, 1983) ed il bovino (Croft, 1983; Stöber, 1990) lo sviluppo di mesoteliomi è stato correlato con l'assunzione di fibre di asbesto anfibolico. E' pertanto possibile che, attraverso un controllo veterinario, questi animali possano essere utilizzati come spia di contaminazione ambientale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Croft W.: Environmental asbestos and mesotheliomas in dairy calves. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **24**: 188, 1983.
2. Donna A., Betta P.G., Bellingeri D., Marchesini A.: New marker for mesothelioma: an immunoperoxidase study. *J.Clin. Path.* **39**: 961-968, 1986.
3. Fetsch P.A., Babati A., Hijazi Y.M.: Utility of the antibodies CA 19-9, HBME-1, and thrombomodulin in the diagnosis of malignant mesothelioma and adenocarcinoma in cytology. *Cancer* **84**: 101-108, 1998.
4. Glikman L.T., Domanski L.M., Maguire T.G., Dubielzig R.R., Curg A.: Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos. *Environ. Res.* **32**: 305-313, 1983.
5. Harbison M.L., Godleski J.J.: Malignant mesothelioma in urban dogs. *Vet.Path.* **20**: 531-540, 1983.
6. Hashimoto N., Oda T., Kadota K.: An ultrastructural study of malignant mesotheliomas in two cows. *Jpn. J. Vet. Sci.* **51**: 327-336, 1989.
7. Hinrichs U., Brugman M., Harps O., Wohlsein P.: Malignant biphasic peritoneal mesothelioma in a horse. *Eur. J. Vet. Path.* **3**: 95-97, 1997.
8. Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580, 1981.
9. Ilgren E.B.: Mesotheliomas of animals: a comprehensive, tabular compendium of the world's literature. CRC Press Boca Raton Ann., London, Tokyo, 1993.
10. Lichtensteiger C.A., Leathers C.W.: Peritoneal mesothelioma in a rabbit. *Vet. Path.* **24**: 464-466, 1987.
11. McCullag K.G., Mews A.R., Pinsent P.J.N.: Diffuse pleural mesothelioma in a goat. *Vet. Path.* **16**: 119-121, 1979.
12. Montag A.G., Pinkus G.S., Corson J.M.: Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: an immunoperoxidase study of 30 cases. *Hum. Path.* **19**: 336-342, 1988.
13. Nordstoga K., Landsverk T.: Papillary epicardial mesotheliomas associated with encephalitozoonosis in blue foxes. *Vet. Path.* **18**: 564-566, 1981.
14. Ordonez N.G., MacKay B.: The roles of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing epithelial mesothelial mesothelioma of the pleura from adenocarcinoma. *Adv. in Anat. Path.* **3**: 273-293, 1996.
15. Riera J.R., Astengo-Osuna C., Longmate J.A., Battifora H.: The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma. *The Am. J. Surg. Path.* **21**: 1409-1419, 1997.
16. Stöber M., Tammen F.C., Veltman P., Stockhofe-Zurwieden N., Pohlenz J.: Beitrag zu Mesotheliose des Rindes: Klinische, postmortale und Umwelt-Befunde. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **77**: 78-83 e 86-87, 1990.
17. Wolfe D.F., Carson R.L., Hudson R.S., Boosinger T.R., Mysinger P.W., Powe T.A., Klaxton M.S., Angel K.L.: Mesothelioma in cattle eight cases (1970-1988). *J.A.V.M.A.* **199**: 486-491, 1991.