

EVIDENZIAMENTO IMMUNOISTOCHEMICO DELLA PROTEINA p53 IN ALCUNI ANIMALI DOMESTICI. PROVE TECNICHE COMPARATIVE

Riccaboni P., Sironi G.

Istituto di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviaria. Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE

Nei vent'anni successivi alla scoperta del gene oncosoppressore p53, si è sviluppato sempre più un ampio settore della ricerca oncologica volto allo studio delle alterazioni di tale gene nelle cellule neoplastiche. Le sue alterazioni, da oltre un decennio considerate le più frequentemente riscontrabili nelle neoplasie maligne dell'uomo, possono essere studiate con tecniche di analisi molecolare, immunocitochimica e sierologica (Soussi et al., 1994). Le indagini finora condotte con metodiche proprie della biologia molecolare hanno studiato le alterazioni biochimiche e geniche responsabili di anomalie funzionali della proteina p53. Altro approccio, più proprio dei patologi morfologi è quello che indaga, con l'ausilio di tecniche immunocitochimiche il come, il dove ed il quanto le alterazioni funzionali della proteina p53 si rendono visibili in forma di sovraespressione. Inizialmente, l'accumulo intranucleare di proteina p53 era esclusivamente considerato frutto di mutazioni geniche ma, con la progressiva acquisizione di nuove conoscenze, il binomio *sovraespressione = mutazione* ha perso valenza assoluta pur restando sempre da considerarsi l'ipotesi più probabile. In più circostanze è stato ricordato che la correlazione tra sovraespressione e mutazione, seppur stretta, è raramente assoluta e che la sovraespressione di proteina p53 assume il puro significato di presenza, a prescindere dalla causa, di alterazione funzionale della proteina stessa (Winford-Thomas, 1992; Hall e Lane, 1994). Tenuta presente questa premessa, l'esame immunocitochimico resta un approccio che consente di indagare la presenza di tali alterazioni in modo semplice e rapido. Diversi fattori rendono vari i protocolli di indagine utilizzati: anticorpi mono- o policlonali di diverso tipo, differenti procedure di smascheramento antigenico che, per varietà delle soluzioni e delle sorgenti di calore impiegate, possono portare a risultati talvolta differenti e comunque tra loro non sempre raffrontabili. Tale problema, già di per se evidente in campo umano, assume ancora maggior importanza in oncologia veterinaria, se si tiene conto che nessuno degli anticorpi disponibili è specificatamente diretto contro la proteina p53 degli animali domestici. E' sulla base di tali considerazioni che abbiamo voluto confrontare differenti metodiche di evidenziazione immunocitochimica della proteina p53 in tumori di alcune delle più diffuse specie domestiche.

MATERIALI E METODI

Il materiale di studio è costituito da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina, di neoplasie spontanee di cane (3 campioni: osteosarcoma, tumore misto maligno e carcinoma squamoso), gatto (4

campioni: un carcinoma squamoso, due adenocarcinomi mammari ed un carcinoma transizionale della vescica), cavallo (4 casi: una leucosi megacariocitica e tre carcinomi squamosi) e bovino (carcinoma squamoso). I campioni sono stati selezionati da più ampia casistica, precedentemente indagata, in quanto positivi in vario grado ad esame immunohistochimico per p53 realizzato con un anticorpo primario (PAb240) che riconosce un epitopo presente in ciascuna delle specie considerate (Soussi, 1999). Sezioni di ogni campione sono state esaminate con la tecnica immunohistochimica ABC secondo differenti protocolli che prevedevano l'uso dell'anticorpo monoclonale PAb240 e del policlonale CM1 e, limitatamente ai campioni di cavallo, anche dell'anticorpo monoclonale DO12 che riconosce nell'uomo un epitopo presente anche nella proteina p53 equina (Vojtesek *et al.*, 1995). Per ciascun anticorpo si è ricorsi a differenti tecniche di smascheramento antigenico che prevedevano alternativamente l'uso di soluzione di urea (6M), tampone citrato (pH 6 e 0,01M) o di una soluzione commerciale (*Buffer for antigen Retrieval, DAKO*) per 10' in pentola a pressione. Fa eccezione l'anticorpo PAb240 che è stato impiegato su sezioni trattate solo con urea, in quanto precedenti prove preliminari avevano dimostrato l'inefficacia degli altri trattamenti.

Dell'immunocolorazione sono state valutate separatamente la distribuzione e l'intensità ed inoltre, con l'intento di quantificare anche gli aspetti negativi legati alla scelta di un anticorpo e/o di una tecnica di smascheramento, sono state valutate le reazioni dubbie della marcatura eventualmente presenti nelle cellule neoplastiche (colorazione nucleolare, o citoplasmatica) o aspecifiche nei tessuti normali. Circa il grado di positività, nelle cellule neoplastiche, sono state considerate 4 classi: negativi (-), assenza di reattività nucleare; moderatamente positivi (+) con percentuale di nuclei positivi stimabile inferiore al 10%; positivi (++), con percentuale di reattività stimata fra 11% e 50% e molto positivi (+++), quando la positività nucleare riguardava almeno il 50% delle cellule neoplastiche. L'intensità della colorazione è stata soggettivamente valutata ed i campioni sono stati quindi suddivisi in 3 categorie: negativi (-); debole marcatura (+) e marcatura intensa (++) . Le aspecificità della immunocolorazione, eventualmente presenti nei campioni, sono state annotate schematicamente come assenza (-) o presenza più o meno abbondante ed intensa (±, +, ++).

RISULTATI

I risultati del presente lavoro vengono riportati sinteticamente, suddivisi per specie, in forma di tabella (Tabb. I-IV).

Tab I: risultati relativi ai campioni di cane

CASO	Ab.	Sol.	Distr.	Int.	Reazioni dubbie e/o aspecifiche	
					cellule neoplastiche	tessuti normali
1	PAb240	U	+++	+	+ nucleolare	
	CM1	U	++	+	++ nucleolare	
	CM1	Cit	-	-	± citoplasmatica	
	CM1	Dako	-	-	± citoplasmatica	
2	PAb240	U	+++	++	+ nucleolare	
	CM1	U	++	+	+ nucleol.; + citopl.	± cellule stromali
	CM1	Cit	++	+	+ nucleol.; + citopl.	
	CM1	Dako	++	+	++ citoplasmatica	
3	PAb240	U	+++	++		
	CM1	U	+++	++		± diffuso
	CM1	Cit	+++	++	± citoplasmatica	± diffuso
	CM1	Dako	+++	++		± diffuso

1) osteosarcoma mammario; 2) tumore misto maligno mammario; 3) carcinoma squamoso

Tab II: risultati relativi ai campioni di gatto

CASO	Ab.	Sol.	Distr.	Int.	Reazioni dubbie e/o aspecifiche	
					cellule neoplastiche	tessuti normali
1	PAb240	U	+++	+		± diffuso
	CM1	U	+++	+	++ citoplasmatica	++ diffuso ++ epidermide
	CM1	Cit	+++	+	++ citoplasmatica	++ diffuso ++ epidermide
	CM1	Dako	+++	+	++ citoplasmatica	++ diffuso ++ epidermide
2	PAb240	U	++	++		
	CM1	U	++	+	± nucleolare	± stroma
	CM1	Cit	-	-		
	CM1	Dako	-	-		
3	PAb240	U	+	+	+ nucleol.; + citopl.	
	CM1	U	+	+		+ diffuso
	CM1	Cit	+	+	+ citoplasmatica	+ diffuso
	CM1	Dako	+	+	+ citoplasmatica	+ diffuso
4	PAb240	U	+++	+		
	CM1	U	+++	-/+	+ nucleol.; + citopl.	+ diffuso
	CM1	Cit	+	-/+	+ nucleolare	+ diffuso
	CM1	Dako	+	-/+	+ nucleolare	+ diffuso

1) carcinoma squamoso; 2 e 3) adenocarcinoma semplice mammario; 4) carcinoma transizionale vescicale

Tab III: risultati relativi ai campioni di cavallo

CASO	Ab.	Sol.	Distr.	Int.	Reazioni dubbie e/o aspecifiche	
					cellule neoplastiche	tessuti normali
1	PAb240	U	+++	++		
	DO12	U	+++	++		
	DO12	Cit	++	+		
	DO12	Dako	-	-		
	CM1	U	+++	++		+ muscolatura
	CM1	Cit	+++	+	± citoplasmatica	+ muscolatura
	CM1	Dako	+++	++	± citoplasmatica	+ muscolatura
2	PAb240	U	+++	++		
	DO12	U	+++	++		
	DO12	Cit	+++	+		
	DO12	Dako	-	-		
	CM1	U	+++	+		+ diffuso
	CM1	Cit	+++	++		+ diffuso
	CM1	Dako	+++	++		+ diffuso
3	PAb240	U	++	+		
	DO12	U	++	+		
	DO12	Cit	-	-		
	DO12	Dako	-	-		
	CM1	U	++	+	+ nucleolare	+ diffuso
	CM1	Cit	++	+	+ citoplasmatica	+ diffuso
	CM1	Dako	+++	+	++ citoplasmatica	+ diffuso
4	PAb240	U	+++	++		
	DO12	U	+++	++		
	DO12	Cit	-	-		
	DO12	Dako	-	-		
	CM1	U	+++	++		+ diffuso

1) leucosi megacariocitica; 2, 3, 4) carcinoma squamoso

Tab IV: risultati relativi al campione di carcinoma squamoso bovino

CASO	Ab.	Sol.	DISTR.	Int.	Reazioni dubbie e/o aspecifiche	
					cellule neoplastiche	tessuti normali
1	PAb240	U	+++	+		
	CM1	U	+++	+	+ nucleol.; + citopl.	
	CM1	Cit	+++	+	+ citoplasmatica	+ diffuso
	CM1	Dako	+++	+	+ nucleol.; + citopl.	+ diffuso

Legenda: Ab. = anticorpo; Sol. = soluzione impiegata per lo smascheramento antigenico;
Distr. = distribuzione della positività; Int. = intensità dell'immunomarcatura

DISCUSSIONE

Dall'esame dei risultati si desume che nelle varie specie, sensibilità e specificità dell'indagine immunohistochimica per proteina p53 possono variare in relazione a vari fattori quali l'anticorpo e la soluzione di smascheramento impiegati. Non è escluso che, come dimostrato nell'uomo, anche la fissazione possa influire significativamente sul risultato. Per quanto concerne le singole specie, nel gatto l'anticorpo policlonale CM1 dà risultati peggiori di quelli ottenuti con il monoclonale PAb240. La marcatura, con il primo anticorpo, è talvolta più debole e, quasi costantemente, sono presenti un segnale aspecifico nei tessuti normali ed una marcatura prevalentemente nucleolare o citoplasmatica di dubbio significato nelle cellule neoplastiche. Con CM1, nel cane e nel bovino, i risultati sono lievemente migliori rispetto al gatto; anche se non comparabili con quanto ottenuto con PAb240. Resta però da segnalare che, secondo la nostra esperienza, anche quest'ultimo anticorpo non ha mai fornito, per intensità del segnale e assenza di aspecificità, i risultati normalmente osservati nelle altre specie. Comparativamente alle altre specie, il cavallo è quello in cui, indipendentemente dall'anticorpo utilizzato, si ottengono i migliori risultati. Essi si possono ritenere, per intensità di marcatura e assenza di aspecificità, ottimali con PAb240 e DO12 ma comunque soddisfacenti con CM1. L'anticorpo DO12, tuttavia, risulta inefficace quando usato con il tampone commerciale Dako e dà risultati meno buoni quando lo smascheramento è effettuato con tampone citrato, poiché la marcatura perde di intensità e, in qualche caso, scompare completamente. Sempre in tema di soluzioni di smascheramento appare chiaro che l'urea ha un maggior potere smascherante, ma tale sua azione, necessaria per l'anticorpo PAb240 ed ottimale per il DO12, non procura vantaggi se impiegata con l'anticorpo CM1. Inoltre, considerando che l'urea, per la sua natura proteolitica, determina più spesso danneggiamento o distacco delle sezioni, lo smascheramento più idoneo per l'anticorpo CM1, sembrerebbe quello che impiega il tampone citrato o la soluzione commerciale. Se si considera l'ampia variabilità dei risultati ottenibili nelle varie specie, è quindi sempre di primaria importanza la scelta del protocollo più opportuno. Attualmente sono note le sequenze complete di p53 di cane, gatto e bovino e parziale di cavallo e ciò dovrebbe consentire di effettuare scelte mirate almeno tra gli anticorpi monoclonali disponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Hall PA e Lane DP: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? – Revisited! *J. Pathol.* **172**, 1-4, 1994.
2. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer* **57**, 1-9, 1994.
3. Soussi T: p53 monoclonal antibodies. http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/p53_pagemab1.html.

4. Vojtesek B, Dolezalova H, Lauerova L, Svitakova M, Havlis P, Kovarik J, Midgley CA, Lane DP: Conformational changes in p53 analyzed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. *Oncogene* **10**, 389-393, 1995.
5. Wyndford-Thomas D: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J. Pathol.* **166**, 329-330, 1992.