

INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE SULLE PROTEINE DEL CITOSCHELETRO IN MAMMELLE FELINE NORMALI, IPERPLASTICO/DISPLASTICHE E NEOPLASTICHE

Sironi G., Faustino A.M.R., Montemezzo N., Veronesi M.C., Mollo A., Mandelli G.

Istituto di Anatomia patologica veterinaria e Patologia aviare

Istituto di Clinica ostetrica e ginecologica veterinaria - Università degli Studi di Milano.

INTRODUZIONE

Alcuni studi riguardanti l'espressione di proteine del citoscheletro da parte di mammelle normali, iperplastico/displastiche e neoplastiche di gatto sono già stati pubblicati (Moore *et al.* 1989, Ivanyi *et al.* 1992 e 1993, Martín de las Mulas *et al.* 1994 a, b), tuttavia essi si riferiscono a limitate casistiche od appaiono prevalentemente orientati allo studio dei vari tipi di citocheratine. Pertanto abbiamo ritenuto utile sottoporre ad indagini immunohistochemiche mirate una abbastanza ampia raccolta di campioni di tessuto mammario, in parte minore riferibili a ghiandole normali ovvero colpite da alterazioni iperplastico/displastiche, in parte maggiore riferibili a veri tumori. Si rileva preliminarmente che, trattandosi di tumori mammari felini, la quota preponderante di questi è rappresentata da forme epiteliali maligne semplici (adenocarcinomi e carcinomi solidi).

Obiettivo della nostra ricerca è stato quello di studiare, collateralmente ai reperti istologici, quali siano in dettaglio le modificazioni immunohistochemiche cui vanno incontro, nella trasformazione neoplastica, alcune proteine del citoscheletro nei diversi tipi di cellule mammarie coinvolte ed, inoltre, quali potrebbero essere, tra dette modificazioni, quelle più significative ai fini di una possibile valutazione prognostica dei corrispondenti tumori.

MATERIALI E METODI

Il materiale preso in esame in questo studio è costituito da campioni di tessuto mammario felino, sia normale (in numero di 4) e iperplastico/displastico (in numero di 7) che neoplastico (in numero di 40). Detto materiale proveniva da 32 mastectomie e da 3 necroscopie, tutte eseguite su pazienti dell'Istituto di Clinica ostetrica e ginecologica veterinaria dell'Università di Milano. Si trattava di gatte, in prevalenza non castrate, appartenenti alle razze Comune europea (29 soggetti), Siamese (4 soggetti) e Persiana (2 soggetti), di età compresa tra 4 e 19 anni e con media di poco superiore a 12 anni. I campioni neoplastici erano così ripartiti: 2 adenomi semplici, 1 adenoma complesso, 17 adenocarcinomi semplici (di cui 3 metastasi, 2 linfonodali ed 1 polmonare), 15 carcinomi solidi semplici (di cui 1 metastasi linfonodale), 1 carcinoma solido complesso. I campioni istologici sono stati fissati in metacarnoy a 4°C per 18 ore, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni seriate di 4 µm. Queste sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina e ciascuna lesione presente è

stata repertata secondo una versione semplificata della classificazione di Hampe e Misdorp (1974).

Le prove immunostochimiche sono state eseguite mediante la tecnica avidina-biotina-perossidasi utilizzando anticorpi monoclonali di topo contro i seguenti antigeni: Pan-Citocheratina (AE1-AE3; dil. 1:1000), Citocheratina 14 (LL002, dil. 1:2000), α -Actina muscolare liscia (1A4; dil. 1:2000), Vimentina (V9, dil. 1:10000). L'immunomarcatura è stata ottenuta con aminoetilcarbazolo o diaminobenzidina quali cromogeni ed infine le sezioni sono state controcolorate con Ematossilina di Meyer.

I risultati delle prove immunostochimiche sono stati valutati con un criterio semiquantitativo. Per ogni anticorpo impiegato, il quadro di immunoreattività di ogni popolazione cellulare costituente la lesione esaminata ha ricevuto un punteggio variabile da 0 a 4, dove 0 indica la totale negatività delle cellule considerate, 1 indica reperti di positività isolati o sporadici, 2 descrive un quadro di immunoreattività intermedia corrispondente al 50% circa di cellule positive, 3 indica un positività molto diffusa o quasi totale delle cellule considerate, 4 infine descrive una situazione in cui tutti gli elementi della popolazione cellulare esaminata sono immunoreattivi.

RISULTATI

I risultati acquisiti vengono esposti per gruppi di reperti, facendo riferimento alle quattro categorie principali dei campioni esaminati: ghiandole normali (n. 4), ghiandole colpite da iperplasia/dislasi (n. 7), adenomi (n. 3) e carcinomi (adenocarcinomi e carcinomi solidi in n. complessivo di 29 più loro metastasi). Le medie numeriche esprimenti il grado di reattività di ciascun tipo cellulare presente sono riportate nelle figg. 1 - 3.

Ghiandole normali. L'epitelio luminale di dotti ed acini è costituito da cellule quasi tutte positive per PAN-Ck e, in due casi, sporadicamente positive anche per Ck 14. Completa è la negatività per alfa-smAct e per Vimentina.

Il mioepitelio di dette ghiandole è positivo, in maniera debole e solo a livello di dotti, per PAN-Ck, mentre risulta discretamente positivo, ancora nella parete dei dotti, per Ck 14. Più intensa e costante è la sua reattività per Vimentina e soprattutto per α -smAct.

Lo stroma è intensamente e regolarmente positivo solo per Vimentina.

Ghiandole iperplastico/dislastiche. Ad un esame superficiale dei preparati i reperti paiono in gran parte sovrapponibili a quelli delle ghiandole normali, ma ad una analisi più attenta emerge qualche significativa differenza, specialmente a carico del mioepitelio (che evidenzia una più intensa marcatura per PAN-Ck e Ck 14, mentre diminuisce quella per α -smAct e per Vimentina) e dello stroma (che mostra un piccolo numero di cellule fuse positive per α -smAct).

Adenomi. Per quanto concerne l'epitelio neoplastico, l'unico dato saliente è rappresentato dalla comparsa di un certo numero (mediamente intorno al 20%) di cellule positive per Vimentina.

Il mioepitelio dei due adenomi semplici presenta immunomarcatura che, salvo per Vimentina, tende ad

apparire attenuata ed in tale attenuazione sembrano giocare un ruolo essenziale le discontinuità dello strato delle cellule basali. Il mioepitelio proliferante dell'unico adenoma complesso presenta invece elevati indici di positività per tutti gli antisieri impiegati, in particolare per Ck 14, alfa-smAct e Vimentina.

Lo stroma evidenzia un crescente numero di cellule fuse positive per alfa-smAct.

Carcinomi. L'epitelio neoplastico degli adenocarcinomi e dei carcinomi solidi, ferma restando la sua reattività per PAN-Ck, evidenzia nel citoplasma una quantità di Vimentina che è superiore a quella degli adenomi e manifesta anche un variabile ma mediamente elevato grado di positività per Ck 14.

Il mioepitelio basale è quasi ovunque scomparso dall'interfaccia tra epitelio neoplastico e stroma e pertanto assai ridotta in tale sede è la presenza di cellule positive per i quattro antisieri considerati. Fa eccezione l'unico caso di carcinoma solido di tipo complesso, nel quale il mioepitelio proliferante esprime in grado elevato la sua immunomarcatura per PAN-Ck ed ancora più intensamente quelle per Ck 14, alfa-smAct e Vimentina.

Lo stroma peri- ed intratumorale evidenzia un alto numero di cellule fuse positive sia per Vimentina che per alfa-smAct, che dovrebbero pertanto essere considerate dei miofibroblasti.

Le quattro metastasi di tumori diversi prese in esame (3 linfonodali ed 1 polmonare) presentano reazioni immunoistochimiche in larga misura assimilabili a quelle delle neoplasie primarie corrispondenti.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che i quattro anticorpi monoclonali da noi utilizzati (PAN-Ck, Ck 14, alfa-smAct e Vimentina) si sono rivelati un valido strumento per lo studio immunoistochimico della mammella felina normale nonché di quella iperplastico/displastica e neoplastica. Essi hanno consentito di dimostrare che nello sviluppo di una vasta gamma di tumori si modifica il quadro istologico ed immunofenotipico di tutti i principali tipi di cellule mammarie, sia epiteliali e mioepiteliali che stromali, e ciò non solo quando direttamente coinvolte nella trasformazione neoplastica, ma anche quando coinvolte del tutto passivamente. Quest'ultima eventualità, da noi già constatata nei tumori mammari del cane (Mandelli *et al.* 1998), si verifica in modo particolarmente palese nei tumori mammari del gatto, che sono quasi sempre caratterizzati dal solo interessamento delle cellule epiteliali, ma presentano contemporaneamente rilevanti modificazioni numeriche, morfologiche ed immunoistochimiche anche a carico delle cellule mioepiteliali e stromali.

Se si passa ad un'analisi più particolareggiata dei reperti, le cellule epiteliali tumorali del gatto, mentre manifestano una moderata attenuazione della positività per PAN-Ck nella sequenza che va dalla normalità alla iperplasia/displasia, ai tumori benigni ed ai tumori maligni, possono nel contempo acquisire reattività nuove, come in parte già rilevato da Ivanyi *et al.* (1992 e 1993) e da Martin de las Mulas *et al.* (1994 b): nei tumori benigni diventano in parte positive per Vimentina e nei tumori maligni lo sono spesso sia per

Vimentina che per Ck 14, come se - sdifferenziandosi sempre più - fossero in grado di elaborare proteine citoscheletriche uguali a quelle delle cellule mioepiteliali e delle cellule embrionarie progenitrici di entrambe. Le cellule mioepiteliali basali dei tumori mammari felini tendono anch'esse a scomparire in seguito alla trasformazione neoplastica degli epiteli luminali soprastanti, non diversamente da quanto si è già constatato nei tumori mammari canini semplici (Mandelli *et al.* 1998) e, prima ancora, nei tumori mammari della donna (Hamperl 1971, Bussolati *et al.* 1980, Gusterson *et al.* 1982, Sternlicht e Barsky 1997), inducendo gli oncologi umani ad ipotizzare che il mioepitelio basale possa svolgere un ruolo di contenimento nei confronti delle cellule epiteliali neoplastiche; scomparendo le cellule mioepiteliali basali, scompaiono ovviamente anche le immunomarcature corrispondenti. Per contro, nei due soli casi di tumore complesso inclusi nel nostro materiale di ricerca (un adenoma complesso ed un carcinoma solido complesso), il mioepitelio proliferante ha espresso in pieno le sue proprietà, risultando soprattutto positivo per Ck 14, α -smAct e Vimentina.

Le cellule del connettivo peritumorale e settale, ferma restando la loro positività per Vimentina, hanno manifestato scarsi cambiamenti tra i reperti mammari normali e quelli iperplastico/displastici, rivelando invece un crescente grado di positività per alfa-smAct nei tumori benigni e soprattutto in quelli maligni e consentendo di evidenziarvi, ancora più che nei tumori mammari canini, una forte prevalenza di miofibroblasti tra gli elementi cellulari dello stroma

In conclusione, si conferma che nella ghiandola mammaria felina la trasformazione neoplastica è accompagnata da importanti modificazioni a carico di tutti gli elementi cellulari presenti. Analogamente a quanto da noi prospettato per i tumori mammari del cane, alcune di queste modificazioni, in particolare la progressiva scomparsa del mioepitelio basale, la positivizzazione dell'epitelio neoplastico per Vimentina e per Ck 14 nonché la comparsa di un grande numero di elementi miofibroblastici nello stroma neoplastico, meritano di essere sottoposti ad attento studio ai fini di una loro possibile utilizzazione come markers di malignità.

BIBLIOGRAFIA

1. Bussolati G, Botta G, Gugliotta P: Actin-rich (Myoepithelial) cells in ductal carcinoma-in situ of the breast. *Virchow Arch.* **34**, 251-259, 1980.
2. Gusterson BA, Warburton MJ, Mitchell D, Ellison M, Neville AM, Rudland PS: Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in the benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.* **42**, 4763-4770, 1982
3. Hampe JF, Misdorp W: Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organisation* **50**, 111-134, 1974
4. Hamperl H: The myoepithelia (myoepithelial cells) – normal state; regressive changes; hyperplasia; tumors. *Current Topics in Pathol.* **53**, 161-220, 1971
5. Ivanyi D, Minke JM, Hageman C, Groeneveld E, van Doornewaard G: Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 304-314, 1992
6. Ivanyi D, Minke JM, Hageman C, Groeneveld E, van Doornewaard G, Misdorp W: Cytokeratins as markers of initial stages of squamous metaplasia in feline mammary carcinomas. *Am. J. Vet. Res.* **54**, 1095-1102, 1993
7. Mandelli G, Faustino AMR, Marchesi FJ, Sironi G, Veronesi MC, Luvoni GC: Espressione di α -actina, citocheratina 14 e vimentina in mammelle normali, iperplastiche e neoplastiche di cane. *Atti S.I.S.Vet* **52**, 143-144, 1998

8. Martin de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A, Carrasco L, Sierra MA, Vos JH: Immunohistochemical distribution of vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in feline tissues. *J. Vet. Med.* **41**, 1-15, 1994 a
9. Martin de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A, Bautista MJ, Gomez-Villamandos JC, Morales C: Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins and muscle actin in feline and human mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.* **111**, 365-381, 1994 b
10. Moore AS, Madewell BR, Lund JK: Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 88-92, 1989
11. Sternlicht M.D., Barsky S.H. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med. Hypotheses* **48**, 37-46, 1997