

STUDIO SULLA VALUTAZIONE DELLA CORRELAZIONE TRA GRADO ISTOLOGICO ED ESPRESSIONE DELLA PGP NEI MASTOCITOMI CUTANEI DEL CANE

CLAUDIO PETTERINO, ENRICA ROSSETTI, MICHELE DRIGO, MASSIMO CASTAGNARO

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova
AGRIPOLIS, Legnaro (PD)*

Riassunto

Il mastocitoma cutaneo canino rappresenta una delle neoplasie che possono richiedere un trattamento chemioterapico oltre che chirurgico. Uno dei fenomeni più importanti nel corso di terapia antineoplastica è l'insorgere della chemioresistenza conseguente all'espressione del gene MDR 1 codificante per la glicoproteina P (Pgp). Lo scopo di questo lavoro è lo studio del pattern di espressione della Pgp nel mastocitoma e la correlazione dei valori ottenuti con il grado istologico. Le indicazioni acquisite potrebbero rappresentare un possibile impiego della Pgp come marker prognostico e terapeutico nel mastocitoma cutaneo canino. I preparati ottenuti da 42 casi di mastocitoma cutaneo canino sono stati classificati secondo i criteri diagnostici standard proposti dalla WHO. La positività alla reazione immunostochimica è stata valutata in 10 aree ad elevato ingrandimento. L'analisi statistica dei dati ha consentito di determinare la significatività delle ipotesi di partenza. I risultati ottenuti indicano che il mastocitoma cutaneo canino presenta una variabilità nell'espressione della Pgp che è correlata al grado istologico della neoplasia.

Summary

Canine cutaneous mast cell tumour represents a malignant neoplasm which frequently needs a combination of surgical and chemotherapeutical treatment approach. One of the most dangerous aspects is the development of multidrug resistance (MDR) due to the expression of MDR 1 gene codifying P-glycoprotein (Pgp). The aim of the study is to determine and describe the intensity of expression of Pgp and find out any relation with the histologic grade of canine mast cell tumour to suggest routine evaluation for Pgp expression as an MDR marker. Tissue sections from 42 cases of canine mast cell tumour were submitted to our laboratory and classified according to WHO diagnostic criteria. Immunohistochemical staining was performed and the positive reaction was evaluated in 10 hpf areas. Statistical analysis of data was performed to evaluate the results. Our results indicate a direct relation between Pgp expression and histologic grade of canine mast cell tumour.

INTRODUZIONE

La glicoproteina P (Pgp) è una proteina transmembrana con funzioni molteplici nel tessuto normale, prevalentemente di tipo secretorio¹. Nelle neoplasie la Pgp è uno dei fattori responsabili della regolazione del trasporto intracellulare dei farmaci con azione anti-neoplastica². L'instaurarsi del fenomeno della resistenza multipla (MDR multidrug resistance), per il quale un'ampia varietà di composti antineoplastici risultano inefficaci sembra essere infatti attribuito ad un accumulo intracitoplasmatico di Pgp³⁻⁸. Il pattern di espressione di questa proteina nei

tumori spontanei del cane è stata ampiamente studiata da Ginn⁹, mentre un utilizzo come fattore prognostico è stato per ora osservato solo nel linfoma del cane¹⁰. Relativamente al mastocitoma non è ancora chiaro se l'espressione della Pgp possa o meno essere correlata con il grado istologico¹⁶ e/o con l'eventuale trattamento chemioterapico. È stato osservato invece che nel tumore mammario canino la Pgp è variabilmente espressa a seconda della malignità della lesione ma deve essere individuato il punto di cut-off al fine di valutare la reale importanza clinica dei dati ottenuti¹¹.

Il mastocitoma cutaneo canino rappresenta la neoplasia cutanea più frequente nel cane con un'incidenza del 20%¹². L'utilità della chemioterapia in questa neoplasia è tutt'ora oggetto di discussione in oncologia veterinaria. Fra le ultime terapie riportate come efficaci sono compre-

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 16/2/2004 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 26/4/2004".

se quelle in cui il protocollo prevede l'impiego di vinblastina, lomustina e prendnisolone con risultati incoraggianti anche se la tossicità ematologica della lomustina può determinarne dei limiti (Hershey et al., 2003, comunicazione personale).

Attualmente i parametri a cui ci si riferisce per considerazioni di tipo prognostico sono rappresentati da stadiazione clinica, grado istologico, localizzazione anatomica, ritmo di crescita della neoplasia, razza animale, AgNORs (Argyrophilic nucleolar staining organizing regions), ploidia, PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen) e valutazione immunohistochimica del K1-67¹².

In base ai dati disponibili, l'opportunità di definire l'esistenza di una relazione tra grado istologico ed espressione della Pgp potrebbe essere uno dei criteri aggiuntivi per impostare un protocollo chemioterapico anche se in generale è stato osservato che la risposta alla chemioterapia è migliore nel caso di mastocitoma di I e II grado¹³⁻¹⁴.

MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato condotto su prelievi di noduli cutanei provenienti da 42 soggetti di specie canina aventi un'età compresa tra i 2 ed i 14 anni (vedi Tab. 1). I tessuti, fissati in formalina (soluzione di formaldeide tamponata al 10%), sono stati successivamente ridotti ed inclusi in paraffina. Le sezioni di tessuto dello spessore di 4 µm sono state colorate secondo la metodica standard ematossilina/eosina e le lesioni sono state classificate secondo i criteri diagnostici dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO)¹⁵.

Immunohistochimica

Per l'indagine immunohistochimica sono state allestite sezioni dello spessore di 3 µm. Le sezioni montate su vetrini polilisinati sono state sparaffinate in xilene e reidratate. L'inibizione delle perossidasi endogene è stata ottenuta immergendo i preparati in una soluzione 1:4 di idrogeno perossido al 3% in metanolo assoluto per 30 minuti a temperatura ambiente. I preparati sono stati poi lavati e reidratati in soluzione di tampone fosfato (PBS) pH 7.2 e quindi posti in tampone citrato al 10% pH 6.0. Dopo il trattamento termico in forno a microonde a 750 Watts (3 cicli della durata di 2 minuti ciascuno), le sezioni sono state raffreddate per 15 minuti e lavate in PBS. Si è proceduto poi ad incubare le sezioni in soluzione di BSA 5% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente al fine di bloccare le reazioni aspecifiche. Successivamente le sezioni sono state incubate per 60 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo primario monoclonale anti-Pgp C494 (Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) diluito 1:100 in PBS, poi con anticorpo secondario anti-immunoglobulina di topo per 30 minuti, utilizzando il sistema EnVision+TM Peroxidase (DAKO Cyomation, Carpinteria, CA, USA). È stato utilizzato il cromogeno 3,3' diaminobenzide tetraidrocloruro (DAB SK-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) per 3 minuti e la controcolorazione è stata eseguita con ematossilina di Harry per 10 secondi.

Campioni di rene canino e di carcinoma epatocellulare

umano sono stati inclusi in ciascuna reazione immunohistochimica come controlli positivi. I controlli negativi sono stati processati sostituendo l'incubazione con anticorpo primario con una soluzione di BSA 2.5 % in PBS.

Valutazione semiquantitativa ed analisi statistica

La valutazione dell'espressione della Pgp nelle sezioni di tessuto incluse nello studio è stata eseguita valutando la percentuale di cellule positive in 10 campi microscopici a 400 ingrandimenti, attribuendo i seguenti punteggi: 0 = 0% di cellule positive; 1 = <10% di cellule positive; 2 = 11-50% di cellule positive; 3 = >50% di cellule positive¹⁶.

La correlazione tra grado istologico e percentuale di positività alla Pgp è stata valutata impiegando il test non parametrico di Spearman. Per verificare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra gruppi di grado istologico diverso e categoria di positività alla Pgp è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI

Dei 42 casi esaminati 24 sono stati classificati come mastocitoma di I grado, 9 di II grado, 9 di III grado (Tab. 1). La metodica immunohistochimica impiegata ha dato i seguenti risultati: 15/24 casi di mastocitoma di I grado, 8/9 di II grado, 9/9 di III grado sono risultati positivi. Nei campioni esaminati la Pgp appare prevalentemente localizzata all'interno del citoplasma dei mastociti neoplastici secondo un pattern omogeneo. La positività interessa anche la membrana citoplasmatica ma solo occasionalmente tale reazione è esclusivamente membranaria. L'intensità della reazione variava da moderata ad intensa (Figg. 1-6).

La correlazione tra grado istologico di espressione della Pgp è risultata essere statisticamente significativa (Rho=0.58; P<0.001). Esistono inoltre, relativamente alla percentuale di espressione della Pgp, differenze statisticamente significative esclusivamente tra gruppi di grado istologico I e III (U=17.50; P<0.01) e II e III (U=7.0; P=0.002).

DISCUSSIONE

La sovraespressione della Pgp si associa alla resistenza a differenti classi di farmaci chemioterapici (daunorubicina, doxorubicina, mitoxantrone, etoposide, teniposide, vinblastina, vincristina, mitomycina C, paclitaxel, actinomycina D, topotecano)². La velocità di efflusso del farmaco dalla cellula si correla ai livelli di espressione della Pgp e all'affinità della stessa per il substrato¹⁷.

In medicina veterinaria uno studio particolarmente dettagliato riguarda la valutazione dell'espressione della Pgp in un'ampia varietà di neoplasie epiteliali e mesenchimali in relazione all'impiego di differenti epitopi proteici impiegati come sistemi di identificazione immunohistochimica della proteina⁹. Ciò ha consentito di ottenere utili informazioni sia relativamente alle neoplasie che maggiormente esprimono la Pgp, sia relativamente all'anticorpo che meglio evidenzia la reazione avvenuta. In particolare, l'impie-

go del clone C494, quale anticorpo primario, che cross reagisce con il tessuto di cane ha determinato la messa a punto di una metodica attendibile e di agevole esecuzione al fine di ottenere informazioni valide in tempi contenuti e perciò proponibile come esame diagnostico di approfondimento dell'istopatologia.

Le neoplasie maggiormente indagate in medicina veterinaria per quanto riguarda i marker di chemioresistenza sono state finora il tumore mammario, il linfoma e in misura minore il mastocitoma per le implicazioni cliniche che le possibili informazioni diagnostiche e prognostiche potrebbero essere fornite da queste indagini.

Relativamente al tumore mammario umano è stata dimostrata l'esistenza di un punto di cut-off, calcolato esse-

re del 20% (percentuale di cellule ad elevato ingrandimento positive all'immunoistochimica per la Pgp) discriminante gli individui in cui è maggiore la probabilità di sviluppare chemioresistenza dovuta alla sovraespressione della Pgp¹⁸⁻²⁰. Un risultato assai simile, 18,40% è stato ottenuto dagli autori in medicina veterinaria. L'implicazione clinica in quest'ultimo caso è notevole, tuttavia ulteriori studi, riguardanti in particolare il follow up, si rendono necessari al fine di valutare i risultati preliminari ottenuti¹¹.

Lo studio dell'espressione della Pgp nel linfoma canino ha consentito di correlare i dati clinici e istopatologici con la possibilità di fornire informazioni prognostiche. Sono stati inoltre evidenziati aspetti di comparazione con la medicina umana, relativi al comportamento biologico della

Tabella 1
Riassunto dei casi esaminati per la valutazione immunoistochimica della Pgp

CASO	ETÀ (anni)	SESSO	RAZZA	GRADO	POSITIVITÀ
1.	5	F	Boxer	I	0
2.	10	M	Boxer	I	1
3.	10	M	Labrador retriever	I	1
4.	2	-	Boxer	I	0
5.	8	Fc	Boxer	I	1
6.	12	F	Cocker spaniel	I	1
7.	8	M	Setter inglese	I	0
8.	3	M	Golden retriever	I	0
9.	8	F	Setter inglese	I	1
10.	5	F	Boxer	I	1
11.	7	M	American Staffordshire	I	2
12.	8	F	Boxer	I	0
13.	4	F	Boxer	I	2
14.	8	M	Bassotto tedesco	I	1
15.	7	-	Meticcio	I	3
16.	-	F	Siberian husky	I	0
17.	10	M	Meticcio	I	0
18.	8	Mc	Meticcio	I	1
19.	10	M	Meticcio	I	1
20.	8	M	Boxer	I	1
21.	6	M	Meticcio	I	2
22.	-	M	Meticcio	I	0
23.	11	M	Yorkshire terrier	I	0
24.	7	M	Labrador retriever	I	1
25.	8	M	Boxer	II	2
26.	7	F	Boxer	II	2
27.	8	F	Boxer	II	1
28.	14	F	Meticcio	II	1
29.	10	M	-	II	1
30.	12	M	Meticcio	II	1
31.	12	M	Meticcio	II	0
32.	8	Mc	Setter inglese	II	1
33.	6	M	Dobermann	II	1
34.	8	F	Boxer	III	3
35.	-	F	Meticcio	III	3
36.	14	M	Labrador retriever	III	3
37.	7	M	Meticcio	III	3
38.	10	M	Boxer	III	2
39.	10	M	Meticcio	III	3
40.	6	F	Boxer	III	1
41.	10	M	Dobermann	III	3
42.	8	M	Boxer	III	3

neoplasia simile al linfoma non-Hodgkin¹⁰.

In generale, le neoplasie finora indagate consentono di riassumere un generale quadro di somiglianza tra neoplasie dell'uomo e del cane, tale da rendere questa specie un

probabile interessante modello di studio del fenomeno della MDR.

Nel mastocitoma lo studio dell'espressione della Pgp ha evidenziato una variabilità di espressione all'aumentare

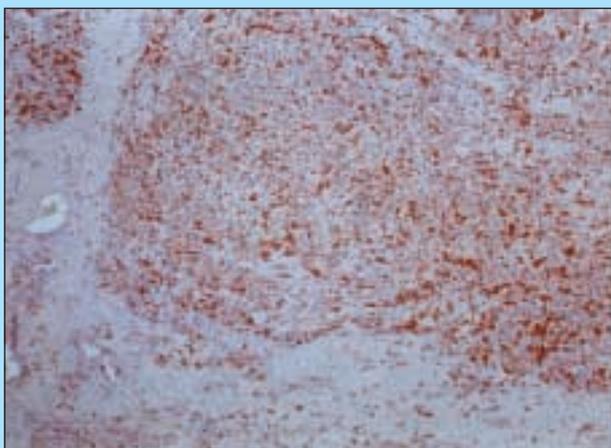


FIGURA 1 - Cane, mastocitoma cutaneo di II grado con elevato numero di cellule Pgp positive ma di intensità variabile (X 40).

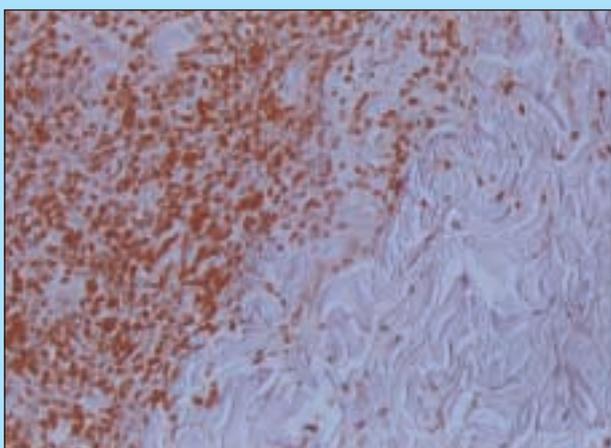


FIGURA 2 - Cane, mastocitoma cutaneo di II grado con elevato numero di cellule Pgp positive. Le cellule appaiono intensamente colorate (X 200).

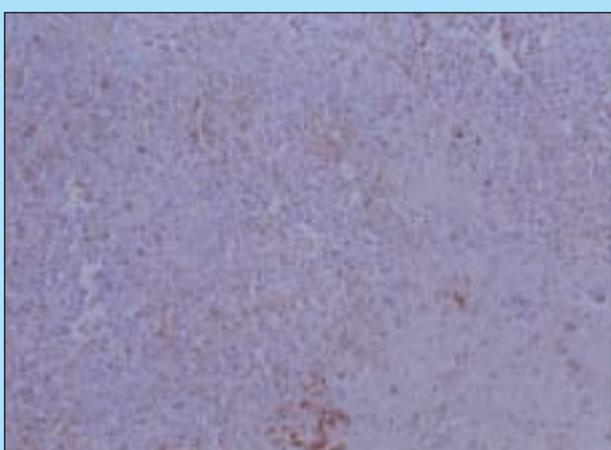


FIGURA 3 - Cane, mastocitoma cutaneo di I grado scarsamente positivo per numero di cellule ed intensità cromatica (X 100).

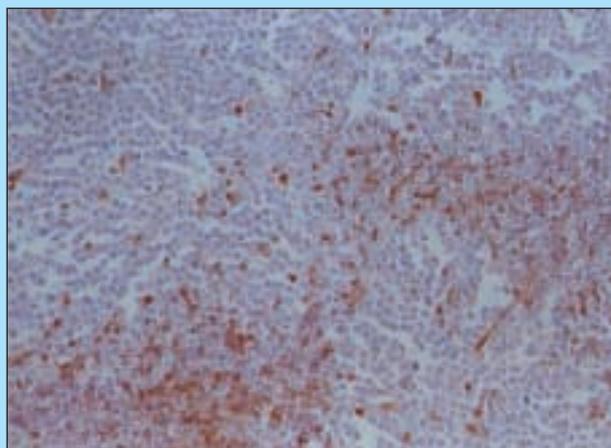


FIGURA 4 - Cane, mastocitoma cutaneo di II grado con moderato numero di cellule Pgp positive di intensità variabile (X 200).

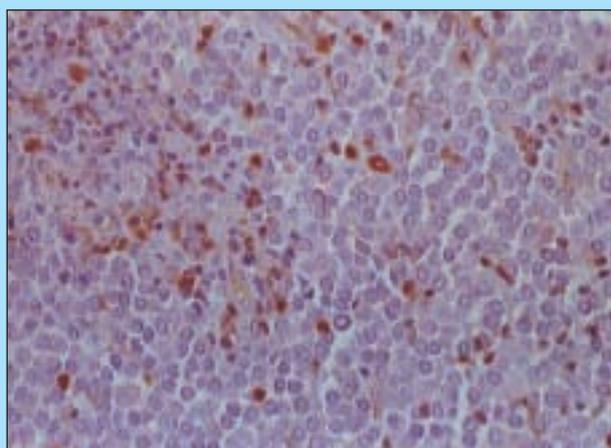


FIGURA 5 - Cane, mastocitoma cutaneo di II grado con basso numero di cellule Pgp positive ma intensamente colorate (X 400).

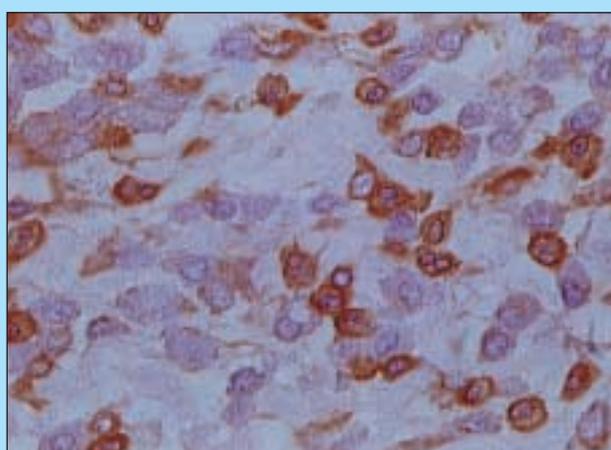


FIGURA 6 - Cane, mastocitoma cutaneo di III grado: le cellule neoplastiche positive presentano un'immunoreazione a livello citoplasmatico e della membrana citoplasmatica (X 1000).

della malignità della neoplasia in accordo a quanto rilevato da analisi preliminari precedenti¹⁶. Esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione della Pgp ed il grado istologico. La rilevanza delle informazioni ottenibili con l'indagine immunoistochimica per la Pgp implica la possibilità, nell'eventuale conferma dei dati ottenuti con successivi studi di follow up, di impiego routinario della metodica di individuazione della proteina associata all'istopatologia diagnostica del mastocitoma cutaneo canino.

Si rendono quindi necessari, oltre che interessanti e di notevole rilevanza clinica, ulteriori approfondimenti volti allo studio dell'effettivo ruolo della Pgp come marker diagnostico e prognostico di MDR dato che essa può essere determinata da fattori multipli.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la cortese collaborazione i Sigg. Enrico Gallo e Davide Trez.

Parole chiave

Glicoproteina P, MDR, resistenza multipla ai farmaci, cane, mastocitoma cutaneo, grado istologico.

Key words

P-glycoprotein, MDR, multi drug resistance, dog, cutaneous mast cell tumour, histologic grade.

Bibliografia

- 1 S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 361-398.
- 2 U.A. Germann, P-glycoprotein - A mediator of multidrug resistance in tumor cells. *Eur. J. Cancer* 32A (1996) 927-944.
- 3 S. Zochbauer, A. Gsur, R. Brunner R., P.A. Kyrle, K. Lechner, R. Pirker, P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 8 (1994) 974-977.
- 4 A. van der Zee, H. Hollema, A. Suurmeijer, M. Krans, W.J. Sluiter, P.H. Willemse, J.G. Aalders, E.G. de Vries, Value of P-glycoprotein glutathione S-transferase pi, c-erbB-2 and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995) 70-78.
- 5 B. Trock, F. Leonessa, R. Clarke, Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 917-931.
- 6 I. Ng, K. Lam, M. Ng, D.L. Kwong, J.S. Sham, Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 134 (1998) 70-78.
- 7 C.P. Leith, Kopecky K.J., I.M. Chen, L. Eijdem, M.L. Slovak, T.S. McConnell, D.R. Head D.R., J. Weick, M.R. Grever, F.R. Appelbaum, C.L. William, Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94 (1999) 1086-1099.
- 8 A. Yuen, B. Sikic, Multidrug resistance in lymphomas, *Clin. Oncol.* 12 (1994) 2453-2459.
- 9 P.E. Ginn, Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet. Pathol.* 5 (1996) 533-541.
- 10 J.J. Lee, C.S. Hughes, R.L. Fine, R.L. Page, P-Glycoprotein Expression in Canine Lymphoma. A relevant, intermediate model of multidrug resistance, *Cancer* 77(1996) 1892-1898.
- 11 C. Petterino, E. Rossetti, V. Zappulli, L. Bargelloni, M. Castagnaro, Evaluation of a cut-off point of PGP expression in canine mammary gland tumours as a diagnostic tool. 21st meeting ESVP, Dublin (Eire) 2003. oral presentation.
- 12 London CA & Seguin B, Mast cell tumors in the dog. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 33 (2003) 473-483.
- 13 Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM, Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor - 41 cases (1992-1997). *J. Vet. Intern. Med.*, 13 (1999) 491-497.
- 14 Meuten DJ, Tumors in domestic animals, 2002 fourth edition, Iowa State Press, Iowa.
- 15 Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ, Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. 1998 vol II, Series ed. Washington DC.
- 16 N. Miyoshi, E. Tojo, A. Oishi, M. Fujiki, K. Misumi, H. Sakamoto, K. Kameyama, T. Shimizu, N. Yasuda, Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (2002) 531-533.
- 17 M. Dicato, C. Duhem, M. Pauly, F. Ries, Multidrug resistance: molecular and clinical aspects, *Cytokines Cell Mol. Ther.* 3 (1997) 91-99.
- 18 Linn S. C., C. K. van Kalken, O. van Telligen, P. van der Valk, C. J. van Groenigen, C. M. Kuiper, H. M. Pinedo, G. Giaccone, Clinical and pharmacologic study of multidrug resistance reversal with vinblastine and bepridil. *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 812-819.
- 19 H. S. L. Chan, G. Haddad, P. S. Thorner, G. De Boer, Y. P. Lin, N. Ondrusek, H. Yeger, V. Ling, P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 325 (1991), 1608-1614.
- 20 J. Schnaider, M. Bak, T. H. Efferth, J. Mattern, M. Volm, P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast Cancer. *Brit. J. Cancer.* 60 (1989), 815-818
- 21 S. C. Linn, H. M. Pinedo, J. van Ark - Otte, P. van der Valk, K. Koekman A. K. Honkoop, J. B. Vermorken, G. Giaccone, Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int. J. Cancer* 71 (1997) 787-795.